A PENICILINA E SEU EMPRÊGO NO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES

PARTE EXPERIMENTAL REALIZADA NO LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE PÔRTO ALEGRE

Dr. RUY VIEIRA DA ROCHA

CONSTITUINDO uma das mais gloriosas conquistas da ciência moderna, a descoberta de Fleming, de uma substância de origem microbiana de alto valor bacteriostático e bactericida, veio depor nas mãos do médico mais um método terapêutico poderoso na luta contra as mais graves infecções.

Iniciando a terapêutica pela sulfamida em 1935, no seu memorável trabalho intitulado "Contribuição ao estudo da quimioterapia antibacteriana", Domagk enriqueceu o arsenal terapêutico dos que militam na clínica com um recurso indiscutivelmente eficaz na cura das estáfilo-estreptococcias, reduzindo assim as estatísticas obituárias e o tempo de duração dessas enfermidades.

Agora, porém, com um aspecto mais sensacional, apresenta-se a Penicilina, notàvelmente muito mais ativa que a melhor sulfamida e completamente atóxica, segundo as observações até à presente data verificadas.

Produto do metabolismo de um cogumelo em determinados meios de cultura, foi observada e estudada por Fleming, cientista inglês, desde 1929, considerada como agente bacteriolítico e por êle relatada pela 1.ª vez em seu artigo "The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *Bacillus influenzae*", descrevendo-a como formada em 12 a 14 dias, destruída pelos alcalís e pelo calor, fàcilmente filtrável (31). Em 1932, Raistrick, Clutterbuck e Lowell, de meios líquidos de Czapek-Dox que modificaram, tentaram obter penicilina, isolando então uma substância sem atividade antibacteriana que extraíram de culturas de *Penicillium chrysogenum*, denominando-a crisogenina e a que atribuíram a fórmula química provável de $C_{18}H_{22}O_6$ (23). Mais tarde Reid, em 1935, confirmava as observações de Fleming, achando que a substância que determinava a inibição das bactérias era relativamente termoestável, não podendo ser separada por diálise ou destilação do caldo de cultura (7-8).

Abraham e Chain acharam que a *Escherichia coli* produzia um enzima a que chamaram penicilase pela propriedade que tinha de destruir a penicilina, caracterizada por se inativar a 90° e readquirir sua capacidade destruidora pela junção de papaína num pH de 6 (1).

Em agôsto de 1940, Chain, Florey, Gardner, Heatley, Jennings M. A., Erwing e Sanders, em seu trabalho publicado no Lancet "Penicillin as a Chemotherapeutic agent" e, um ano depois, Abrahan, Chain, Sletcher, Gardner, Heatley, Jennings e Florey em "Further observations on Penicillin" deram as bases de produção e purificação e ensaiaram, clínica e experimentalmente, a penicilina "in anima nobile" e "in vitro", observando a sua eliminação pela urina e a sua ação inibidora sôbre vários organismos patogênicos.

O estudo da Micologia tomou então um incremento notório e as mais variadas espécies de cogumelos foram cultivadas e as substâncias dêles extraídas foram ensaiadas na avaliação de propriedades antimicrobianas.

Ewart estudou o *Penicillium citrinum,* determinando a existência da citrinina. Barger e Dorrer em 1934 analisaram as substâncias químicas formadas pelo *Penicillium puberulum* e pelo *Penicillium aurantivoirens* (11).

Raistrick e Smith em 1935 cultivaram raças de *Aspergillus terreus,* em líquido de Czapek-Dox a 24° C (70).

Em 1938 e 1939 Anslow e Raistrick isolaram o fumigatin do *Aspergillus fumigatus Fresenius,* cultivado no meio de Raulin-Thom e o espinulosin do *Penicillium spinulosum* (8). Waksmann e Woodruff em 1940 isolaram de culturas de *Actinomyces* o *actinomicin* α e o *actinomicin* β, ativos para muitas bactérias Gram-positivas na diluição de 1:100 000 000 e para as Gram-negativas na concentração de 1:5 000. Sua ação seria observada sòmente "in vitro", sendo dotado de um poder altamente tóxico para as espécies animais (87). Welsch confirmou estas experiências em 1941 (93). Robinson e Waksman, considerando-o também altamente tóxico, comprovaram ser parcialmente eficaz na infecção do rato pelo *Trypanosoma equiperdum* (81).

Dutcher, em dezembro de 1941, relata a inibição do crescimento dos *Staphylococcus aureus, albus e viridans,* pela gliotoxina produzida pelo *Gliocadium fimbriatum* e estuda a sua estrutura química (30).

Oxford, Raistrick e Smith cultivaram o *Penicillium puberulum* e o *Penicillium cyclopium* em meios de Raulin-Thom e de Czapek-Dox e admitem que a sua atividade antimicrobiana seja devida ao ácido dihidropenicílico formado (62).

Birkinshaw, Chambers e Raistrick cultivaram em meio de Czapek-Dox, com 5 % de glicose, o *Penicillium stipitatum,* descrevendo o ácido estipitático (13).

Provàvelmente baseado nos estudos de Anslow e Raistrick, em 1938 e 1939, Wiesner, em março de 1942, estuda a ação do *Aspergillus clavatus,* descrevendo uma substância diferente da penicilina, porém com uma atividade semelhante e relativamente estável, mais ou menos tolerável pelas espécies animais (96).

Gardner e Chain, em 1942, estudando os *Proactinomyces,* retiraram uma substância bacteriostática a que chamaram proactinomicina, mais estável que a penicilina porém muito tóxica e de difícil produção (40).

O *Penicillium claviforme* foi estudado por Florey, Jennings e Chain, que isolaram dos meios de cultura uma substância que inibia especialmente o *Staphylococcus,* a *Escherichia coli* e o *Streptococcus piogenes.* Esta substância seria a claviformina, que, na diluição de 1:800 000, destruía grande quantidade de leucócitos em uma hora, sendo doses mínimas fortemente tóxicas para os animais de experimentação (20).

Wilkins e Harris examinaram cuidadosamente 100 espécies de fungos, verificando que os *Aspergilli,* na proporção de 40 %, davam inibição ao desenvolvimento da *Escherichia coli,* do *Streptococcus aureus* e *Pseudomonas pyocyanea;* os *Penicillia* 25 %, enquanto que outros fungos, considerados *Fungi Imperfecti,* davam freqüentemente resultados negativos. Êstes autores concluíram que a formação de substâncias inibidoras dependia em grande parte dos meios de cultura e que aquêles fungos que não as produziram nas condições por êles provadas, poderiam seguramente produzí-las uma vez postos em meios adequados (97).

O fumigatin e o clavicin, retirados respectivamente do *Aspergillus fumigatus* e do *Aspergillus clavatus* foram estudados por Waksman, Horning e Spencer (90). O clavicin parece ser semelhante à substância verificada e isolada por Wiesner em março de 1942 (96) e por Anslow e Raistrick em 1938 e 1939 (8). Estas substâncias seriam ativas para os microrganismos Gram-positivos e teriam um poder limitado para os Gram-negativos.

Timonin, em novembro de 1942, estudou uma substância semelhante à citrinina retirada de uma cultura de *Aspergillus,* com grande poder bacteriostático que não era destruído pela autoclavação até 30 minutos a 15 lb. de pressão (86).

O ácido puberúlico e o ácido puberulônico, produtos metabólicos de grande número de espécies de *Penicillia,* foram estudados por Oxford, Raistrick e Smith que lhes artibuíram fraca atividade bactericida em grandes diluições, não conseguindo estabelecer a estrutura química exata (66).

Birkinshaw, Raistrick e Smith estudaram o *Penicillium resticulosum* em meio de Czapek-Dox, constatando uma inibição para *Staphylococcus aureus* na diluição de.... 1:160 000 (12).

O *Aspergillus flavus,* conforme Busch e Goth descrevem em março dêste ano, produz uma substância antibacteriana quando cultivado em meio de Czapek-Dox modificado, inibindo o *Staphylococcus aureus* e *albus* na diluição de 0,008 por cc. de caldo. O *Streptococcus hemolyticus,* o *Pneumococcus, Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis,* foram inibidos numa diluição 5 vêzes maior. Em animais de experimentação provaram a dose letal média, sem ter entrado em pormenores (18).

Êstes estudos e os que vêm sendo realizados com relação a outras substâncias capazes de destruir ou impedir total ou parcialmente o crescimento dos microrganismos patogênicos, tais como a tirocidina, a gramicidina, o prodigiosin, a clororrafina, esta estudada por Dupaix-Lasseur, assim como a patulina, pó branco cristalino, produzido pelo *Penicillium patulum,* e cuja aplicação tópica nasal é eficientíssima no tratamento das infecções das vias respiratórias superiores, afirmando-se a cura dos resfriados e da gripe em 24 horas, permitirão sem dúvida eleger mais tarde a substância ideal para a cura das diversas entidades mórbidas causadas pelos germes até agora conhecidos.

Apareceram trabalhos de Heilmann, Dorothy e Herrel que fizeram o estudo comparativo da atividade antibacteriana da penicilina e gramicidina em 1942 (43). Em dezembro do mesmo ano, Herrel, Heilmann, Dorothy e Williams publicam observações clínicas do uso da penicilina na Mayo Clinic, concluindo pela admirável ação curativa desta substância (45).

Wallace e Dorothy, na Mayo Foundation, realizaram estudos interessantes quanto aos efeitos da gramicidina, tirocidina e penicilina nas culturas de gânglios linfáticos de mamíferos. Constataram êsses autores que a penicilina não possuía efeitos hemolíticos para os eritrócitos, em meio de cultura de tecido, apesar da sua atividade bactericida ser maior que a da gramicidina e tirocidina (49).

Rammelkamp em janeiro dêste ano faz um estudo comparativo da ação da penicilina e da gramicidina nas infecções (75). Bordley e outros concluem pela melhor tolerância dos tecidos à penicilina, comparativamente com a gramicidina e tirocidina (16).

Autores inglêses e americanos já têem cuidadosamente observado os usos e as indicações, a absorção e a eliminação, a toxidez e a atividade da penicilina, contribuindo com as primeiras tintas no amplo estudo que se delineia.

Bem avaliando o grande alcance de ação da nova droga e conseqüentemente a iniludível vantagem da produção em massa para largo emprêgo nos hospitais de sangue, reduzindo consideràvelmente o tempo de internamento dos soldados com ferimentos de guerra infectados e complicações sépticas, que são solicitados, por necessários ao front, num prazo estremamente curto, Howard Florey não fêz privilégios de seus estudos, pelo contrário, como cientista puro, revelou suas conquistas ao mundo inteiro, viajando até aos Estados Unidos onde divulgou e orientou seus processos de cultivo, de extração e de purificação da penicilina. Foi então nesse grande país prestada uma homenagem ao sábio inglês, denominando de Florey à unidade Oxford de penicilina.

Compreendendo também os cientistas americanos a contribuição que se lhes exigia para o esfôrço de guerra, lançaram-se imediatamente ao estudo do assunto e trabalhos após trabalhos vêm sendo publicados e quase todos os grandes laboratórios se dedicam com intenso afã à produção dessa substância, presentemente para uso exclusivo das fôrças armadas.

Não ficaram impassíveis os cientistas brasileiros que, adotando as técnicas estrangeiras e criando próprias, ganham terreno para estabelecer no Brasil a produção da penicilina. Grandes óbices porém se antepõem a essa realização, pois como já disse Fleming: "Its present method of preparation from molds is not an economic process" (31). Grandes capitais precisarão ser invertidos em instalações próprias para uma produção metódica.

No Rio de Janeiro, Raymundo Moniz de Aragão, com sua autoridade inequívoca, em colaboração com Militino Rosa, da Academia Nacional de Química, tem trabalhado incansàvelmente e os frutos de seu trabalho serão os louros de uma organização industrial.

Hassib Aschar, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, publicou interessante estudo sôbre a morfobiologia do *Penicillium notatum* e faz ensaios com penicilina para determinação do seu poder bacteriostático.

Em Manguinhos, no Instituto Osvaldo Cruz, também vem sendo estudado o cultivo do *Penicillium notatum* e a atividade da penicilina.

No Instituto Butantan também não ficou descurada tão importante questão.

Em Pôrto Alegre, no Departamento Estadual de Saúde Pública, pelos drs. Newton Neves da Silva e Jandyr Maya Faillace vem sendo produzida, tendo sido empregada nos mais variados casos clínicos não só nesta capital como no interior do Estado, nos Estados vizinhos e em Buenos Aires e Montevidéu.

A penicilina produzida no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina, como no Departamento Estadual de Saúde, tem sido gratuitamente cedida para tratamento de casos graves de infecções, na Argentina e no Uruguai, com os mais animadores resultados. E os nossos casos já são numerosos.

Determinadas exatamente as entidades nosológicas para as quais a penicilina tem a sua máxima indicação, não hesitamos em afirmar que se esboça no horizonte da bacteriologia a alvorada de uma nova era sob cuja luz fecunda frutificarão os esforços de um pugilo de homens doutos e abnegados, devotos da ciência, para maior glória da Medicina Universal.

ESTUDO MICOLÓGICO DO PENICILLIUM NOTATUM

A penicilina que obtivemos e que empregamos nas nossas experiências é elaborada por um cogumelo classificado no ramo dos *Eumycetes*, classe dos *Ascomycetes*, ordem *Plectascales*, família *Aspergilaceas*, gênero *Penicillium*, espécie *notatum*, pela classificação de Dodge de 1935, atualizada por Floriano Paulo de Almeida em 1939, correspondendo à 11.ª divisão de Engler & Gilg.

O gênero *Penicillium*, têrmo que significa "pincel de pintor", criado por Linck em 1809 e descrito já em 1720 por Micheli, compreende cogumelos formados por um micélio filamentoso, septado, formando conidióforos eretos terminando por um conjunto de células férteis chamadas métulas. As métulas se dispõem em série única ou em séries superpostas dando origem a conídios e dão o aspecto dos pêlos de um pincel. Como espécie tipo dêsse gênero deve ser considerado, segundo Thom, o *Penicillium expansum* da classificação de Linck em 1809.

O *Penicillium* que cultivamos, cujas raças são originárias do "United States Department of Agriculture" e do Laboratório de Peoria Ill., U. S. A. está pormenorizadamente estudado por Hassib Ashcar que descreve os seguintes detalhes microscópicos das culturas: "As culturas de 2 a 3 dias em temperatura ambiente, apresentam um micélio desenvolvido constituído por filamentos septados ou hifas retilíneas ou en-

roladas, muitas vêzes se anastomosando 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 de vassoura. Êle é formado por um conidióforo, filamento fértil que se divide em ramos; êsses por sua vez se dividem dando râmulos ou, diretamente, dão origem às métulas que sustentam células alongadas esporógenas denominadas fiálides ou esterigmatas. Estas 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". "Após 5 a 7 dias de cultivo aumenta muito o número de aparelhos conidianos, os quais então libertam grande quantidade de exosporos". "Os exosporos são geralmente redondos, hialinos; assemelham-se a hematias humanas, porém são menores, medindo de 3 a 5,2 micras de diâmetro. A maior parte, entretanto, (cêrca de 85 %) possui diâmetros que variam de 4 a 5 micras. Segundo a fase evolutiva podem-se encontrar esporos pedunculados em início de germinação. Os pedúnculos são expansões citoplasmáticas acidófilas que se coram em vermelho pelo método de Gram, ao passo que os esporos, que são basófilos, se coram em violeta" (42). Esta descrição representa tudo o que poderíamos dizer sôbre o aspecto microscópico das culturas em líquido de Czapek-Dox modificado.

O aspecto macroscópico das culturas é variável de acôrdo com o meio de cultivo, desenvolvendo-se muito bem em temperaturas que oscilem entre 18 e 26° C. Temperaturas mais altas ou mais baixas prejudicam visìvelmente o seu desenvolvimento e a produção máxima de penicilina se verifica à temperatura de 24° C., segundo as últimas observações feitas nos Estados Unidos (79) que pudemos comprovar aqui. Abraham já recomendava como ótima a temperatura de 24° C., sendo pois a estabilidade da temperatura um fator de grande relevância. Com as variações nictemèricas mais ou menos sensíveis a que estavam sujeitas as nossas culturas, verificamos muitas vêzes um retardamento e até mesmo a sua degeneração, com diminuição consideràvel da produção de penicilina, impondo-nos estabelecer medidas que aproximassem o mais possível a temperatura ambiente do grau ótimo, para que não perdêssemos apreciáveis quantidades de meios semeados e em pleno desenvolvimento.

Crescendo bem nos mais variados meios, pouco sensível às variações do pH, seu aspecto é diferente assim como a sua

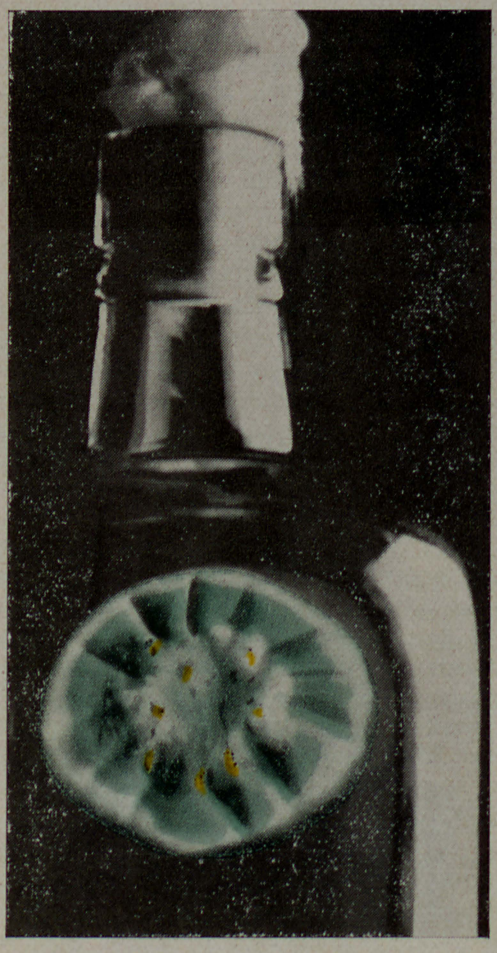


FIG. N.° 1

Aspecto duma colônia circular de Penicillium Notatum, no seu 4.° dia de desenvolvimento, cultivada em meio sólido com água de côco.

pigmentação quando cultivado em meios sólidos, líquidos ou em culturas submersas.

Nos meios sólidos, ou seja no meio de Sabouraud modificado, 24 horas após a semeadura feita com suspensão de esporos em água destilada ou sôro fisiológico, já se notam pequenos botões de crescimento, brancos, aveludados, que vão crescendo circularmente e se pigmentando com uma côr verde-azulada, variáveis, em faixas concêntricas. Ao 4.º e 5.º dia observamos grandes colônias circulares de 4 a 6 centímetros de diâmetro, de aspecto rugoso-raiado, sêcas no centro e aveludadas na periferia.

Conforme nos mostra a figura n.º 1, a parte central é leve e irregularmente corada de uma tonalidade esverdeada, com numerosas e pequeninas gôtas inicialmente incolores que vão gradualmente aumentando e se impregnando de amarelo, mais freqüentes nas regiões esbranquiçadas centrais. Ao redor dessa zona central estende-se uma faixa justa-periférica de tonalidade verde mais escuro, terminando-se por uma orla branca veludínea.

A parte inferior da cultura é úmida e de côr branco amarelada, e, à medida que se desenvolve o cogumelo, vai se impregnando o meio de uma côr amarela tanto mais intensa quanto mais velha fôr a cultura.

Nos meios líquidos de Raulin modificado, no de Czapek-Dox e em outros que temos usado, os caracteres das culturas são um pouco diferentes. O desenvolvimento é mais vagaroso, as colônias são muito menores e as côres não são tão acentuadas. Ao 6.º ou 7.º dia começa o meio, quando incolor, a se colorir de um verde amarelado, atingindo o máximo de coloração ao 8.º ou 9.º dia. Essa côr é dada pela penicilina secretada pelo cogumelo e que se difunde pelo meio de cultura. Em meios cujas substâncias que os compõem já por si os tornam corados, não conseguimos distinguir a formação e a concentração maior de penicilina. Nestes as colônias são sempre mais espêssas e coradas, aderindo às paredes dos frascos. Temos assim a impressão de que a intensidade de coloração do meio é dependente da maior ou menor capacidade de pigmentação ou de produção de penicilina, sabendo que esta capacidade varia de acôrdo com a composição do meio de cultura e mesmo com a raça de *Penicillium* cultivada.

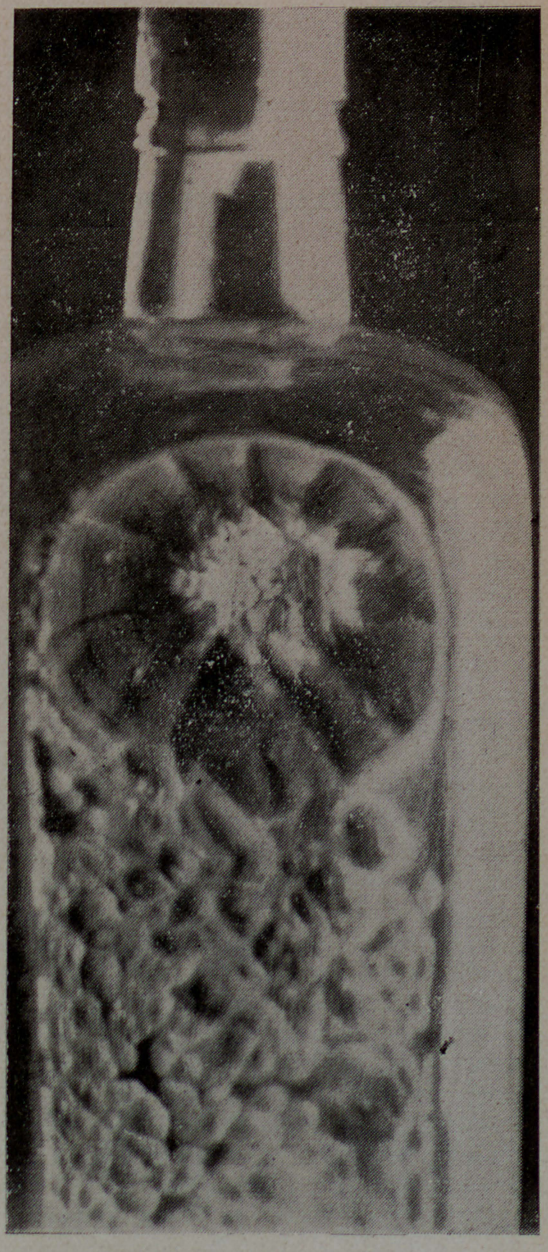


FIG. N.º 2

Aspecto da mesma colônia no 7.º dia de desenvolvimento, notando-se a dispersão feita por tôda a área do meio de cultura e a formação de inúmeras gotas de penicilina.

A inoculação da emulsão dessas culturas, feita por nós em cobaios e em coelhos, não determinou lesões ou alterações patológicas que levassem à morte êsses animais, sendo que pela necrópsia nada verificamos sob o ponto de vista macroscópico que nos pudesse orientar no sentido de uma infestação micósica dos mesmos.

Quanto às propriedades bioquímicas do *Penicillium notatum*, Hassib Ashcar conclui que êste cogumelo fermenta a dextrose, sacarose, maltose e glicerina sem desprendimento de gases, por outro lado não fermentando a adonita, o amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, sorbita, trealose e xilose. Não age sôbre o leite e não liquefaz a gelatina, não produz indol e não reduz os nitratos a nitritos.

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DOSAGEM DA PENICILINA

Uma vez formada nos meios de cultura, em tempo variável, dependente da composição dêsses meios, da raça de *Penicillium* e das condições ambientes, a penicilina será extraída, tratando-se o meio cultivado, segundo técnicas ensaiadas por Abraham e outros colaboradores. Vários solventes foram propostos, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o éter e o acetato de amila. O clorofórmio não se mostrou eficaz pois dava uma perda em potencial relativamente muito grande.

Abraham descreve sua técnica pormenorizadamente no seu trabalho publicado no Lancet 241, 177 (agôsto 16, 1941), sendo esta técnica, ligeiramente modificada, a que utilizamos para extrair a penicilina dos meios de cultura (2).

Reunidos os meios de cultura em balões de 3 litros acidificamos com ácido fosfórico mais ou menos ao pH 2,0, adicionamos em seguida a 1/4.ª parte de éter, agitando fortemente até que se tenha formado uma emulsão que se localiza na superfície do balão em que estão contidos. Passamos a seguir ao filtro de decantação, deixando em repouso alguns minutos, até que fiquem bem definidas as zonas de separação, momento em que escoamos o meio de cultura que já tem cedido ao éter a penicilina que continha e que fica concentrada na emulsão superficial. Reduzindo o tempo de manipulação e evitando perdas maiores de substância, pela evaporação do éter, preferimos centrifugar imediatamente esta emulsão, que nos dá nos tubos de centrifugação um depósito inferior de água, um médio de resíduos, ficando na superfície todo o éter contido com a penicilina.

Em relação com a concentração de lactose ou glicose os meios de cultura tornam-se mais ou menos viscosos, sendo que nestes casos não há formação de emulsão, ficando o éter completamente livre de resíduos, o que dispensa a centrifugação.

Nestas condições êste éter é reunido novamente em filtro de decantação e adicionado da 10.ª parte de água destilada. Formam-se duas zonas distintas, uma inferior, constituída pela água destilada, incolor, e outra superior de éter amarelo-ouro, cuja intensidade de coloração varia de acôrdo com a quantidade de penicilina nêle contida. Tratando então esta mistura pelo $NaCO_3$ e agitando, conseguimos passar tôda a penicilina do éter para a água destilada. Repetimos estas operações várias vêzes na intenção de maior purificação, obtendo na manipulação final a dissolução da penicilina em água bidestilada, passando após em papel de filtro. Foi observado que o $NaHCO_3$ dá melhores resultados para a passagem da penicilina do éter para a água, com perda menor de atividade.

Recomendado o filtro de Seitz, por ser capaz de esterilizar grandes quantidades de líquido em pouco tempo, fomos forçados, entretanto, na sua falta, a esterilizar as soluções de penicilina obtidas, em velas de

filtro Chamberland F ou L3, adaptadas a frascos de Kitasato.

Técnica trabalhosa e relativamente impraticável para filtração de grandes quantidades de penicilina, serviu, entretanto, perfeitamente para nossas experiências.

Abraham finalmente purifica o produto pela extração com água, descoloração com carvão vegetal, adsorção na alumina, eluição e extração com éter e água (3).

Segundo êste mesmo autor a sua produção era de 500 litros semanais de meio contendo penicilina numa concentração de ½ unidade por cc. O material sêco, purificado para uso terapêutico, teria uma atividade de 40 a 50 unidades por mg. Para obter mais ou menos 1 grama de material terapêutico, correspondendo a 45 000 Unidades, eram necessários 100 litros de meio, contendo inicialmente 150 000 Unidades. Nestas condições sòmente 1/3 da penicilina estava presente no final da extração e purificação. Mais recentemente tem sido tentada a dupla purificação da penicilina, porém, talvez devido à presença de agentes inibidores, talvez devido à oxidação da penicilina em presença de traços de peróxido, nos grandes volumes de éter utilizados, aumenta a decomposição da penicilina à medida que aumenta a sua pureza (4).

A penicilina foi retirada, no vácuo, do éter para o álcool absoluto sem perder a atividade.

Instituindo-se então o processo de análise cromatográfica pela Alumina de Brockmann, verificou-se que o álcool a 95°, usado com o adsorvente, causava uma completa inatividade.

Como substâncias adsorventes para a penicilina são usados a Alumina de Brockmann e o Fluorisil, com ótimos resultados, dando 80 a 90 % das unidades avaliadas antes da purificação. Segundo êste processo cromatográfico a mais forte adsorção é observada na região de 2 200 Angstrom. As qualidades da drierite como adsorvente não foram ainda bem definidas.

Smith declara que a acetona dá ótimos resultados para a obtenção de penicilina.

Finalmente Cook, em dezembro de 1942, no Biochemical Journal, 36, XXIII, descreve um novo método químico-cromatográfico, considerando que a penicilina pela sua grande labilidade não pode ser tratada pela maioria dos processos químicos usuais. Uma solução de penicilina em éter é filtrada através de uma coluna de um veículo que adsorva a água. Êste veículo Cook descreve como sendo uma associação de sílica com pequenas porções de álcali ou hidróxido alcalino terroso ou carbonato. Nestas condições os pigmentos mais fortes da penicilina impura ficam fixados na parte superior da coluna, sendo que os mais fracos descem lentamente. Constituindo um processo de aplicação geral, dá ótimos resultados para a penicilina, ficando a fração de penicilina biològicamente ativa concentrada numa parte bem estreita da coluna. O material obtido dá uma inibição de 50 % no desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* na diluição de 1/100 000 000, contendo 750 U. F. por mg (24).

Outras variedades dêste processo têm sido praticadas, usando-se a Argila de Attapulgus, a alumina fibrosa, o fluorisil, a lã de vidro, óxido de sincrônio e o magnésio.

Abraham (3), em dezembro de 1941, em seu trabalho "Purification of Penicillin", publicado em Nature, 148, página 758, descreve três métodos de purificação, dependentes da distribuição entre solventes, adsorção e redução. A distribuição entre água e éter ao pH 2 e pH 6, adsorção de impurezas pelo carvão vegetal e análise cromatográfica sôbre alumina, revela uma côr amarela de sal de Bário, contendo 150 unidades por mg. Após redução dêste material num solvente neutro com Al-Hg o pigmento que sobra é adsorvido pela alumina e o sal de bário branco, obtido do líquido sobrenadante, contém 240 U. F. por mg (3).

Êste mesmo autor em março de 1942 obtém um sal purificado de bário tratando a penicilina pelo acetato de amilo em água, cromotografia pela coluna de alumina, tratando a fração ativa pela amálgama de alu-

mínio. A preparação assim obtida teria uma atividade de 450 a 500 U. Oxford por mg (4).

Meyer, Chaffee, Hobby e outros publicaram em julho de 1943 a sua técnica de obtenção e purificação, tendo como produto final um sal de amônio de penicilina, sob a forma de um pó microcristalino amarelo-escuro (61).

Nesta técnica as soluções de penicilina são tratadas pelo sulfato de amônio, pelo $CHCl_3$ éter de petróleo e clorofórmio-benzol.

Catch, Cook e Heilbron, (19) em novembro de 1942, estudaram um processo cromatográfico de adsorção da penicilina por solventes orgânicos, como éter, acetato de amilo em uma coluna de sílica-gel, com bases inorgânicas. Obtêm assim a penicilina sob a forma de sal de estrôncio que, depois de sêco no vácuo, apresenta a seguinte fórmula: $C_{24}H_{34}O_{11}N$ Sr, sendo de côr amarela, não tendo atividade ótica.

Grande preocupação tem merecido o estudo relacionado com a determinação potenciai da penicilina. Florey e colaboradores descreveram um método para dosagem, denominado método de Oxford, que necessita, para ser praticado, de um meio nutritivo feito em placas de Petry (36).

Alexandre Fleming, em julho de 1942, analisa dois métodos para dosagem em que usa soluções de penicilina cuja inibição sôbre o *Staphylococcus aureus* seria comparada com uma inibição padrão do mesmo germe dada por soluções de sulfatiazol e sulfapiridina (35).

Fundamentalmente baseado no empirismo da medida das áreas de inibição, uma Unidade Oxford corresponderia à quantidade de penicilina contida numa determinada solução, que inibisse o desenvolvimento de uma cultura de *Staphylococcus aureus* num círculo de 24 mm de diâmetro. São feitas então soluções de penicilina a vários títulos que são colocadas, na quantidade de 1 cc., em pequenos cilindros de vidro, no centro do meio de cultura em que já se está desenvolvendo o *Staphylococcus*. Aquela solução, que desse um diâmetro de inibição com a medida arbitràriamente estipulada, marcaria então uma potência equivalente a uma Unidade Oxford.

O meio de Sabouraud ou de gelose simples foram sugeridos, entretanto é forçoso considerarmos, à vista já de uma crítica superficial, várias condições em que muitas vêzes verificamos diferenças no número de unidades avaliadas para uma determinada solução de penicilina, seja em relação à composição e ao pH do meio de cultura, seja em relação à raça e à virulência do *Staphylococcus aureus* cultivado, seja também relativamente ao lapso de tempo decorrido entre o enchimento dos cilindros e a colocação das placas na estufa, a 37°.

Sabemos que a penicilina tem sua ação prejudicada quando em contato com meios muito ácidos ou muito alcalinos, diminuindo nestas condições sua capacidade de difusão pelo meio. Os maiores círculos de inibição são obtidos num pH de 6 a 6,5. Não resta dúvida também que deverá ser considerada a altura do meio de agar, sendo que os meios de pequena espessura, lògicamente darão maior difusão da penicilina em tôrno dos cilindros em que está contida.

Não devemos desconsiderar, por outro lado, as diferenças que poderão ser observadas com raças diversas de *Staphylococcus aureus*, sendo que algumas poderiam ser inibidas em zonas bem delimitadas, enquanto que outras o seriam em zonas difusas limitadas, não esquecendo que a quantidade de material inoculado nas placas também influenciaria o tamanho das zonas.

Inoculadas as placas com *Staphylococcus aureus*, êstes teriam seu máximo desenvolvimento à temperatura de 37°, ao passo que a penicilina teria sua potência gradativamente diminuída por sua acentuada termolabilidade. O inverso teríamos se colocássemos as placas de Petry inoculadas a baixa temperatura, o que daria naturalmente parada do desenvolvimento do *Staphylococcus*, facilitando a difusão da penicilina.

Êsse método de bio-ensaio, assim como

os que até agora têem sido propostos, favorece a leitura de resultados errôneos. Seria forçoso estabelecerem-se regras universais que determinassem condições constantes para avaliação do poder bactericida em cálculo de Unidades Internacionais. Que se estabeleçam meios de cultivo uniformes em que sejam inoculadas raças de *Staphylococcus aureus* de origem e em quantidade e virulência determinadas, em suspensão "standard", limitando-se o tempo de ação da penicilina em relação à temperatura em que deverá impedir o crescimento do *Staphylococcus aureus.*

Acreditamos que dificuldades persistirão, resultando processos difíceis e dispendiosos, quiçá muitas vêzes impraticáveis, enquanto não fôr possível descobrir-se a natureza química exata da penicilina.

Para dosagem das diversas partidas de penicilina que obtivemos, usamos o método de Oxford, descrito por Florey, em cujo meio de agar em placas de Petry cultivamos uma suspensão de *Staphylococcus aureus,* e no qual fizemos uma cavidade central de 1 cm de diâmetro por ½ cm de profundidade. Após a inoculação conservamos durante 2 horas na estufa a 37°, depois das quais colocamos na cavidade 1 cc. da solução conhecida de penicilina, em títulos diferentes, a partir de 1:5. Fazíamos a leitura sempre 6 horas depois, medindo o diâmetro da zona de inibição, dando para 24 mm o valor de uma unidade.

Posteriormente a Florey tem sido usado um método de bio-ensaio feito em tubos de caldo simples em que se coloca uma série de diluições de penicilina conhecidas, sendo que a leitura será feita pelo tubo cujo título em penicilina impediu o desenvolvimento do *Staphylococcus,* o que é observado pela falta de turvação do caldo.

Êste método oferece margem às mesmas considerações que fizemos para o método das placas de agar.

A quantidade de "inoculum" usado pelos diversos autores está em tôrno de uma alça de platina "standard" de 0,2 de um caldo de cultura de 24 horas, para cada tubo.

CARACTERES FÍSICOS E QUÍMICOS DA PENICILINA

Já em 1929 Fleming dava algumas informações sôbre os caracteres da penicilina, achando que o seu agente ativo não era destruído pela fervura durante alguns minutos, porém que, em soluções alcalinas, fervida por uma hora, seu poder era consideràvelmente diminuído. A autoclavação a 115° por 20 minutos a destruía completamente. Achou-a insolúvel no éter e $CHCl_3$ (31).

Estudos posteriores vieram modificar grande parte destas concepções, trazendo novos e importantes esclarecimentos.

Clutterbuck e outros, em 1934, constataram que a penicilina era ràpidamente inativada pela oxidação, pela evaporação no éter, ou em soluções muito ácidas ou muito alcalinas, sendo moderadamente estável ao pH 5 ou 6 (23).

Abraham, Chain, Fletcher e outros, em 1941, estudaram detalhadamente a extração e a purificação da penicilina, declarando que a solução aquosa de penicilina é pràticamente estável quando conservada em refrigerador (2). Um ano mais tarde, em continuação a seus trabalhos, Abraham constatou que a penicilina é instável em presença de álcalis ou ácidos diluídos, de metais pesados ou de agentes oxidantes e mesmo de muitos enzimas bacterianos (6).

Nestas condições compreendemos a necessidade da rigorosa assepsia durante a produção.

Abraham, Chain e Holiday, declaram que a penicilina é solúvel no éter, álcool, acetona, acetato de etila, acetato de amila, ciclohexanona e dioxana, sendo pouco solúvel no benzeno, clorofórmio e tetracloreto de carbono. São êstes mesmos autores que

afirmam que a atividade da penicilina diminui quando exposta ao ar. No estado sêco é muito higroscópica e mantém seu poder antibacteriano indefinidamente. Durante a inativação por ácidos ou álcalis formar-se-iam novos grupos tituláveis, originando-se perda de CO_2 pela fervura (6).

Vários sais de penicilina foram feitos na intenção de provar-se a melhor estabilidade, sem ter-se chegado, entretanto, a resultados satisfatórios. Surgiram assim os sais de Sódio, Cálcio, Zinco, Bário, Níquel, Cádmio, Estrôncio e Amônio.

Karl Meyer e outros verificaram em 1942 que a solução de ácido livre de penicilina era menos ràpidamente destruída, sendo o sal de amônio obtido o mais estável. Entretanto, na forma sêca, tanto o ácido como o sal, seriam conservados sòmente no vácuo (60).

Si se reduzir a proporção de água a menos de 1 e meio a 2 %, fechando em ampôlas, no vácuo, o sal sêco de penicilina poderá ser conservado por períodos muito longos, suportando, mesmo, muito bem temperaturas de 60° C.

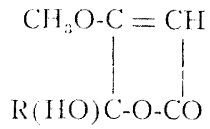
Hobby, Meyer, Chafee e Dawson, (53) analisando uma penicilina parcialmente purificada, sugeriram a fórmula provável de $C_{14}H_{19}NO_6$ ou $C_{14}H_{17}NO_5 + H_2O$.

Chain em 1941 declara que a penicilina é um ácido forte com dois ou um múltiplo de dois grupos ácidos. O sal de bário purificado teria 55 % de C. e 6,3 % de H. Os grupos metoxílicos não poderiam ser reconhecidos, estando presentes dois grupos OH. O sal de bário admitiria com metais pesados a formação de sais solúveis em água (21).

Karl Meyer e outros, em 1942, confirmam êstes resultados de Chain e sugerem a mesma fórmula química, acrescentando que a penicilina é fortemente dextrógira e apresenta uma absorção máxima a 2750 Angstrom (60).

Abraham, Chain e Holiday nesse mesmo ano indicam que o sal de bário é de um ácido dibásico e a sua molécula contém 1 carbonila, 1 carboxila latente, 2 grupos acetiláveis e finalmente 5 grupos C-Me e ligas duplas dificilmente redutíveis. Sugeriram a fórmula química de ..... $C_{24}H_{32}O_{10}N_2Ba$. (6).

Oxford, Raistrick e Smith (66) apresentam a seguinte fórmula estrutural para o ácido penicílico e para o ácido dihidropenicílico:



(R = CH_2:C(CH_3) para o 1.º; $(CH_3)_2$ CH para o 2.º respectivamente

Couthard, Michaelis e outros (26) afirmam que nas culturas de *Penicillium notatum*, feitas em líquido de Czapek-Dox, se formaria uma substância semelhante à penicilina, inicialmente chamada de penicilina α e posteriormente de notatina. Sua enérgica ação bactericida seria observada em presença do oxigênio e da glicose, desaparecendo quando em presença de catalase. Sendo um pó levemente amarelado, é fàcilmente solúvel na água e pouco solúvel nos solventes orgânicos. Seu aspecto espectrométrico a caracteriza como um enzima amarelo com propriedades próximas às de uma flavoproteína. Sua atividade seria destruída num pH abaixo de 2 ou acima de 8, pelo aquecimento a 60° C., em solução aquosa, e a 30° em solução de hidratos metálicos.

Esta substância, na diluição de 1:1 bilião, inibe completamente o desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, assim como de muitos outros germes Gram-negativos e Gram-positivos.

Doisy, Roberts, Cain, Muir, Reithel e outros, em janeiro de 1943, publicaram um trabalho detalhado sôbre a formação em meios de cultura de *Penicillium notatum*,

de uma substância que denominaram de penicilina β, de atividade antibacteriana acentuada, porém provocando acúmulo no organismo dos animais de experiência (80).

Walter Kocholaty, em abril de 1943, obtém de culturas de *Penicillium notatum* Westling uma substância antibacteriana que denominou "penatina" (55). A penatina seria semelhante porém não idêntica à notatina, e diferente da penicilina β de Doisy e outros autores. A penatina é uma proteína não dialisável nos tubos comuns de celofane, mais ou menos estável ao pH entre 2 e 7, tendo ação antibacteriana acentuada, sendo porém relativamente tóxica.

Nancy Atkinson, pretende ter isolado, de meios, em que foram cultivados esporos de *Penicillium notatum,* outra substância bactericida que denominou "penicidina", com propriedades mais ou menos semelhantes às da penicilina, porém incompletamente purificável (10).

Abraham, Chain, Baker e Robinson, em janeiro de 1943, obtêm por hidrólise da penicilina, a penicilamina com a seguinte fórmula: $C_6H_{11}O_4N$, HCl, contendo, provàvelmente, uma ou duas moléculas de água de cristalização, aparentando ser um aminoácido, com propriedades, entretanto, diferentes das dos aminoácidos conhecidos, lembrando uma relação entre um amino-carbo-hidrato e o ácido ascórbico (7).

FARMACODINÂMICA GERAL E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL DA PENICILINA

Fleming foi o primeiro pesquisador a afirmar que a penicilina não era tóxica nem irritante para os tecidos mesmo em grandes doses, administrada por via bucal, intramuscular ou endoflébica, nos vários animais de laboratório.

Chain, Florey, Gardner, Heatley, Jennings, Eving e Sanders (20), procuraram determinar o poder tóxico da penicilina, concluindo que, mesmo em grandes quantidades, administradas por via intravenosa, não se notavam efeitos tóxicos para os ratos. As superdosagens aparentavam discreta intoxicação. Por via subcutânea, grandes doses repetidas de 3 em 3 horas, não determinaram alterações no organismo dêsses animais, parecendo apenas diminuir momentâneamente o número de glóbulos brancos que, entretanto, era normalizado com a suspensão da medicação. Segundo êsses mesmos autores, em alguns casos raros, o rim apresentou modificações no seu parênquima. Em gatos doses maciças de penicilina não determinaram efeitos tóxicos, não se modificando os batimentos cardíacos e a pressão arterial, assim como os movimentos respiratórios, quer no ritmo, quer na amplitude.

Uma diminuição no número dos batimentos cardíacos foi observada, quando em corações isolados e perfundidos se adicionaram soluções de penicilina a 1:5000, fenômeno que, aliás, desaparece pela perfusão continuada em simples soluções de Ringer-Locke.

Harry Robinson em seu artigo "Toxicity and efficacy of penicillin", publicado em janeiro de 1943 no J. Pharmacol. 77, página 70, estuda os efeitos da penicilina, injetando de 0,5 a 2 gramas por quilo de rato, via endoflébica, declarando que as doses mais elevadas causavam a morte de 60 a 100 % dos animais. Administrando injeções subcutâneas de 3 em 3 horas, dia e noite, durante 5 dias, a dose letal mínima de penicilina era de 3,2 gramas por quilo de pêso e por dia, porém a necrose do local da injeção era produzida por pequenas doses de 0,8 grama por quilo e por dia. Entretanto a dose terapêutica que conferia uma boa proteção oscilava em tôrno de 2 a 4 miligramas por dia (82).

Hobby, Meyer e Chafee em ratos infetados por via intraperitonial com altas doses de *Streptococcus hemolyticcus* e *Pneumococcus,* administraram doses de 0.75

a 1 mg de penicilina, com bons resultados mesmo quando o tratamento foi executado 8 horas depois da infecção. Uma injeção subcutânea de 3 mg de penicilina, em suspensão oleosa, protegeu 66 % dos ratos contra a inoculação intraperitonial de doses mil vêzes mortais de *Streptococcus hemolyticus* (52). A quantidade ótima de penicilina administrada, foi calculada por Powell e Jamieson em 20 mg dados dez vêzes durante 3 dias por via oral, em ratos infetados intraperitonialmente com *Staphylococcus aureus*. Nestas mesmas condições, para o sulfatiazol, seria de 20 mg dados 5 vêzes durante 3 dias. Na mesma ocasião empregava o bicarbonato de sódio para prevenir a acidez gástrica. Com doses letais de 1,8 e 0,67 por quilo, respectivamente para os sais de sódio e amônio, foi notada apenas uma congestão dos pulmões. Após a injeção seguiu-se intensa dispnéia produzindo-se a morte em 1 a 3 minutos. Com doses sub-letais a respiração se tornou muito rápida com alguma prostração, sinais êstes que desapareceram depois de 15 minutos a poucas horas. Ficou então concluído que a penicilina não é tóxica dentro da dosagem terapêutica (69).

Abraham e outros já em 1941 (2), experimentaram em gatos, por via endovenosa e intraduodenal, soluções de penicilina sob a forma de sal de sódio, constatando a sua absorção e a excreção parcial pela urina, estando presente em forte concentração na bile. Por via oral não foram observados resultados satisfatórios, pois a substância é destruída pelo ácido clorídrico do estômago. Entretanto, a administração por via oral com bicarbonato de sódio, deu resultados aparentes, verificando-se a atividade antibacteriana da urina.

McKee e Rake são de opinião que os testes feitos em ratos, com sais de penicilina purificados, revelaram que esta substância relativamente não é tóxica (57).

Florey e Jennings afirmam que os leucócitos, em uma solução a 1 % de penicilina, correspondendo a 240 unidades por miligrama, resistem por 1 hora. Os sais de cálcio de penicilina causam, depois de injetados por via endoflébica ou subcutânea, sensíveis perturbações, sem maiores conseqüências (36).

Powel e Jamieson trataram 240 ratos infectados com *Pneumococcus*, com 10 doses orais de 20 mg cada uma de penicilina e 5 doses orais de 30 mg de sulfapirina, demonstrando os resultados finais que a penicilina exerceu maior proteção contra os tipos I e II de *Pneumococcus* e teve moderada ação sôbre o tipo III, sendo contudo melhores os resultados que os obtidos com a sulfapiridina (68).

Robson e Scott trataram coelhos com úlceras oculares provocadas por *Staphylococcus aureus*, empregando penicilina em um ôlho e sulfatiazol no outro ôlho do mesmo animal, dando a penicilina resultados melhores e mais rápidos, 30 % superiores ao sulfatiazol (83).

Tillet, Cambier e Harris, em março de 1943, trataram ratos infetados com *Pneumococcus* sulfamido resistentes, com 25 a 250 unidades Florey por via intraperitonial diàriamente, durante quatro dias, sendo feita a primeira dose 10 a 15 minutos depois da infecção. Número igual de ratos nas mesmas condições de infecção foram tratados com 0,02 a 0,04 miligramas de tirotricina, também por via intraperitonial, poucos minutos depois da inoculação, tendo obtido resultados variáveis. Os ratos tratados com penicilina sobreviveram, enquanto que os outros nem sempre resistiram à infecção (85).

ATIVIDADE E INDICAÇÕES TERAPÊUTICA DA PENICILINA

Fleming já em seu trabalho inicial preconizava a ação antisséptica da penicilina no tratamento das infecções produzidas pelos organismos sôbre os quais agia. Segundo êste mesmo autor a ação da penicilina era muito acentuada em relação aos *coccus* piogênicos. Achou Fleming então que a penicilina na concentração de 1:100 inibia o crescimento de muitos germes, à exceção dos *Enterococcus*, Bacilos difteróides, *Ba-*

cillus influenzae, grupo colitífico. Por serem destruídos todos os agentes que normalmente se encontram associados aos germes resistentes à penicilina, criou-se desta maneira um método eficiente de isolamento dêstes microrganismos, que são obtidos assim quase num estado de pureza.

Stuart Craddock obtém culturas puras de bacilo acne empregando soluções de penicilina (27).

Hobby, Meyer, Chafee e Dawson acham que a penicilina, é mil vêzes mais ativa que a sulfamida em relação aos organismos aeróbios e gram-positivos anaeróbios, sendo esta ação nitidamente característica em presença de bactérias em franca multiplicação no sôro ou no sangue total (53).

Blake e Craige observaram a atividade especial da penicilina para infecções estafilocócicas pulmonares ou ainda para as determinadas pelo *Streptococcus hemolyticus* (14).

Abraham, Chain e outros (1) confirmam a ação bacteriostática da penicilina para os estreptococos e estafilococos, sendo que o número de bactérias a ser inibido não teve influência. O poder bacteriostático da penicilina não foi atacado ou diminuído pela ação do pus, pelos produtos da decomposição hidrolítica das proteínas, pelos produtos da autolise dos tecidos e mesmo pelo sangue. Esta propriedade merece registo especial, pois para o tratamento local de ferimentos infetados onde a sulfamida não tem ação, por ser destruída pelas substâncias formadas pela reação dos tecidos aos germes atacantes, a penicilina teria então uma ótima indicação.

Para certos autores, nas concentrações terapêuticas usuais seria inicialmente bacteriostática, apresentando uma ação bactericida posterior.

Hobby, Meyer e Chafee (51), em junho de 1942, realizaram experiências com as quais determinaram que a penicilina atua como um agente bacteriostático ou mesmo como agente verdadeiramente bactericida, em contraste pois com a ação acapsulogenética da sulfamida, que daria apenas um retardamento da média de crescimento. Esta atividade da penicilina seria então semelhante à da gramicidina e tirocidina que impedem a multiplicação dos germes e produzem uma diminuição definida no número de organismos por cc.

Hobby e outros colaboradores confirmam as observações de Florey feitas em 1941, sôbre a atividade antibacteriana da penicilina, e acrescentam que a penicilina não é absorvida ou destruída durante a sua ação, decrescendo o número de organismos gradativamente até serem destruídos 99%, tendo atividade tanto bacteriostática como bactericida dependentes das condições experimentais (52).

Hobby, Meyer e Chafee (50) provaram a atividade bacteriostática e bactericida da penicilina "in vitro" para os seguintes germes:

Pneumococcus, Streptococcus hemolyticus, Staphylococcus, Meningococcus, Gonococcus, Streptococcus viridans, Bacillus subtillis, Clostridium welchii, Vibrião séptico, Clostridium hystolyticus, Bacillus sporogens, Bacillus oedematiens, Bacillus sordelli, Lactobacillus, Cryptococcus hominis.

Não teria atividade entretanto para os seguintes:

Aemophylus influenzae, Bacillus coli, Bacillus typhi, Bacillus dysenteriae, Bacillus proteus, Bacillus paratyphosus A, Bacillus enteritidis, Bacillus pyocyaneous, Bacillus florescens, Bacillus prodigiosus, Bacillus Friedlander, Staphylococcus albus, Micrococcus albus, Monilia albicans, Monilia krusei, Monilia candida.

Êstes autores concluem que os organismos Gram-negativos são relativamente resistentes à penicilina, porém os cocos Gram-negativos patogênicos, incluindo o *gonococcus* e o *meningococcus,* são sensíveis, enquanto que as variedades saprófitas são insensíveis.

Em outubro de 1943, Leonard Piccoli, de acôrdo com a mais recente bibliografia, relacionou os germes sensíveis e insensíveis à penicilina na seguinte ordem:

GERMES SENSÍVEIS	GERMES INSENSÍVEIS
Staphylococcus aureus	Aerobacter aerogenes
citreus	Bacillus anthracis *
epidermidis	Friedlander
pyogenes	paratyphosus A
Streptococcus equinus	prodigiosus
hemolyticus	proteus
ignavus	pyocyaneus
mitis	subtilis * *
pyogenes	typhosus
pyogenes-Lancefield	Enterococcus
grupo A	Escherichia coli
salivarius	Haemophilus influenzae
viridans * * * *	Lymphogranuloma venereum, virus do
Clostridium botulinum	Micrococcus flavus
chauvoei	Monilia albicans
hystoliticum	Monilia candida
oedematiens	Mycobacterium tuberculosis
oedematiens maligni	Photobacterium Fischeri
perfringens	Pseudomonas fluorescens
septicum	Salmonella * * *
sporogenes	Shigella dysenteriae
tetani	paradysenteriae
Welchii	Streptococcus faecalis
Meningococcus	liquefaciens
Pneumococcus tipo I	Treponema pallidum
II	Trypanosoma equiperdum
III	
V	
VIII	
Actinomyces	
Bacillus anthracis *	
sordelli	
subtilis * *	
Corynebacterium	
Cryptococcus hominis	
Gonococcus	
Lactobacillus	
Micrococcus lysodeikticus	
Neisseria catarrhalis	
Sarcina	

* e * * (*Bacillus anthracis e subtilis*), podem ser sensíveis ou insensíveis à penicilina, dependendo de condições ainda não bem explicadas.

* * * (salmonella) Florey e Jennings verificaram que a *salmonella* poderia ser sensível quando em presença de sais de penicilina purificada e em grandes concentrações.

Entretanto a penicilina poderá ter uma fraca atividade para os germes Gram-negativos si bem que o seu maior poder é verificado em relação aos Gram-positivos.

* * * * Quanto ao *Streptococcus viridaus* temos observado que é resistente à penicilina, como agente septicêmico e nas endocardites malignas.

Rake, McKee e Jones, em novembro de 1942, estudaram a atividade antiluminescente da penicilina e a sua inibição em relação ao *Photobacterium Fisheri,* comparando esta atividade com a do ácido aspergílico, gliotoxina, clavivacin e actinomycin α.

Doroty Heilman e Herrell fazem estudos comparativos da atividade da penicilina e da gramicidina em culturas de tecidos, concluindo pela maior atividade bactericida da gramicidina para o *Streptococcus faecalis,* sendo que os produtos de autólise dos tecidos não afetaram a atividade da penicilina (44).

Rammelkamp e Maxon (72), em dezembro de 1942, verificaram que diferentes raças de *Staphylococcus* eram variáveis às inibições pela penicilina.

Isolaram então raças de *Staphylococcus* de 14 pacientes com infecções locais ativas, sendo em 4 casos, duas osteomielites crônicas e dois empiemas, observada uma leve e progressiva resistência desenvolvida no curso do tratamento.

McKee e Houck (59), em abril de 1943, estudaram então detalhadamente a penicilino-resistência do *Pneumococcus III*. Em meios de cultura fizeram diluições de penicilina e nêles cultivaram o *Pneumococcus*. Êste germe assim cultivado, quando passado para outro meio que contivesse maior concentração de penicilina ativa, continuava proliferando e depois de 55 passagens desenvolveu-se em meios com 55 vêzes mais penicilina.

Em trabalhos de Rammelkamp e Maxon (72), ficou provada a resistência do *Staphylococcus* à penicilina, atenuando-se a virulência dêsses germes. Antes de sua passagem por meios contendo penicilina, aproximadamente 10 germes são suficientes para matar um rato e depois de 55 passagens são necessários 900 000 000 dêsses mesmos germes para constituir a dose letal. Passando-se, por outro lado, os bacilos assim atenuados por meios normais, não admitiram mais a sua virulência anterior, contràriamente, àqueles organismos que adquirindo a sulfamido-resistência, conservam a sua virulência inalterada.

Assim é que a penicilino-resistência é acompanhada de modificações morfológicas ou metabólicas que parecem ser definitivas.

Tolerada admiràvelmente pelo organismo, em doses terapêuticas, a penicilina é quase integralmente eliminada pela urina, estando presente também na bile, conforme alguns autores. Outras formas de eliminação não foram, entretanto, discutidas.

Rammelkamp e Keefer, em março de 1943, no *Am. J. Medical Science 250*, fazem um estudo pormenorizado da absorção, excreção e toxidez da penicilina em injeções intratecais. Indivíduos normais excretavam 10 % da dose durante as primeiras 37 horas. Em dois indivíduos com meningite a excreção foi mais rápida: 78 % em 17 horas, mais ou menos.

Os indivíduos normais acusaram dor de cabeça, vômitos, aumento do número de leucócitos e da pressão do liquor quando eram administradas doses de 10 000 U. F. Com doses de 5 000 U. F. havia leve aumento dos leucócitos e leve dor de cabeça. Contràriamente os indivíduos atacados de meningite não apresentaram êstes efeitos (73).

A penicilina excretada pela urina seria aproveitada, extraindo-se por meio dos solventes usuais, podendo ser utilizada novamente em indivíduos infetados, com os mesmos resultados terapêuticos.

Parte da penicilina deveria ser destruída, devido à sua termolabilidade, quando em curso pela circulação a uma temperatura de 37°.

Entretanto, talvez devido à rapidez de eliminação, conserva ainda sua atividade, demonstrando não ser atacada ou destruída ao nível dos humores, ou o ser apenas parcialmente.

Inúmeros têm sido os trabalhos publicados, relacionando experiências e observações com o emprêgo da penicilina por tôdas as vias de administração medicamentosa, proporcionando a sua difusão por todos os setores do organismo.

Abraham, Chain, Fletcher e outros, experimentaram a administração oral da penicilina em tabletes com pequenas doses de bicarbonato de sódio para neutralização da acidez gástrica que destruiria a ação da penicilina. Entretanto, concluíram êstes autores que, por via oral, os efeitos não eram sempre constantes. Fizeram também a administração retal e constataram a destruição da penicilina pelas matérias fecais.

Entretanto, quando dada em cápsulas que resistam ao ataque dos sucos gástricos e se dissolvam sòmente em presença dos sucos entéricos, a sua atividade é maior.

Os melhores resultados obtiveram pela administração intravenosa, atribuindo a substâncias pirogênicas as leves reações que se desencadearam em alguns casos. Fazem também a aplicação tópica da penicilina,

confirmando que esta substância não é neutralizada pelo pus (2).

Rammelkamp e Keefer confirmam êstes resultados, baseando seus estudos na absorção da penicilina pelas vias oral, intraduodenal, retal, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intrapleural, intra-articular e intrabursal.

A dose oral foi absorvida parcialmente e a retal foi quase totalmente ineficaz. Todavia a administração intraduodenal ofereceu boa e rápida absorção e a concentração no plasma foi semelhante à observada com as injeções intramusculares e intravenosas, dando uma excreção urinária de 18 % da dose proporcionada. Depois das injeções intravenosas a concentração inicial no plasma corresponde a 10 U. F. por cc., baixando ràpidamente com uma eliminação urinária de 58 % (74). E' interessante frisar que êstes autores não observaram a presença da penicilina no líquido céfalo-raquidiano, na saliva ou nas lágrimas.

As injeções intra-articulares, intrabursais e as feitas em cavidades com coleções purulentas, mostraram uma difícil absorção.

As injeções intrarraquidianas não revelaram sintomas tóxicos, quer em indivíduos normais ou em indivíduos com meningites e abcessos cerebrais, sendo que nos primeiros a absorção e a eliminação foram mais vagarosas que nos últimos.

Rammelkamp e Keefer observaram que em pacientes com insuficiência renal a penicilina não era eliminada pela urina.

Êstes autores aconselham a administração de doses iniciais máximas de 10 000 U. F. pelas vias indicadas para cada caso em particular, acompanhadas sempre de doses repetidas de 5 000 cada 24 horas.

Gladys Hobby Meyer e Chafee administraram doses de 1 a 3 miligramas por via subcutânea, intravenosa ou intraperitonial, a intervalos apropriados, em infecções pneumocócicas. Pela via subcutânea usavam suspensões oleosas de penicilina altamente eficientes (53).

Herrel, Heilman e Williams, (45) na Mayo Clinic empregaram a penicilina em casos de infecções faciais, da bôca, celulites nasais, abcessos encapsulados, pielonefrites pós-operatórias, feridas infetadas por estafilococo e estreptococo não hemolítico e num caso de endocardite. Em todos êstes casos os resultados foram muito animadores, sendo que na endocardite houve apenas uma melhora temporária. Foram empregadas de 30 000 a 40 000 U. F. em 24 horas, dissolvendo-se metade da dose em 1 litro de sôro fisiológico ou de solução de glicose a 5 % administrando-se 100 a 200 cc. ràpidamente e o restante à razão de 30 a 40 gôtas por minuto. A outra metade da dose é dissolvida em 1 litro de sôro e injetada gôta a gôta, 8 a 10 horas mais tarde.

Êstes mesmos autores, em casos de septicemias por estafilococo, conseguem negativar as hemoculturas em 22 horas após a administração de 16 000 unidades de penicilina, em 1 litro de sôro fisiológico à razão de 25 a 30 gôtas por minuto. A dose do primeiro dia foi aumentada para 32 000 unidades, sendo o tratamento continuado com doses descrescentes até 5 000 unidades no 14.º dia, sem sintomatologia tóxica.

Florey (37), em março dêste ano, tratou vários casos com excelentes resultados, sendo 1 infecção ocular, 4 osteomielites, 3 septicemias, 1 trombose do seio cavernoso, 1 osteomielite crônica e um caso de meningite estreptocócica. Em uma endocardite bacteriana subaguda pouca melhora obteve, sobrevindo a recaída quando o tratamento foi interrompido.

Florey aconselha como dose ótima a de 15 000 unidades por via intramuscular cada 24 horas, concluindo que doses pequenas, porém freqüentemente repetidas, são mais eficazes que doses macissas, pois é necessário manter-se no sangue uma concentração mais ou menos constante da substância bactericida. Estendeu Florey suas observações a casos de infecções das mastóides, de blefarites, conjuntivites e dacriocistites, nestes, em particular, instilando gôtas de soluções contendo de 800 a 1 200 unidades por cc. ou fazendo pensos de vaselina com penicilina.

Para administração parenteral, se houver contra-indicação no emprêgo de soluções

de cloreto de sódio, a solução a 5 % de glicose seria a mais indicada. Pela via bucal seu emprêgo é extremamente desagradável pelo gôsto amargo, além de ser pouco eficaz pela destruição sofrida quando em presença dos sucos gástricos, apesar da alcalinização pelo bicarbonato de sódio.

Rammelkamp aconselha a via intravenosa para o tratamento de infecções generalizadas, preferindo-se o uso local nas infecções das serosas, pleura e articulações. As infecções determinadas pelo *Streptococcus hemolyticus* e pelo *Pneumococcus* necessitam doses menores que as determinadas pelo *Staphylococcus*. Êste autor usa concentrações de 1 000 unidades por cc. para injeções intravenosas, 200 unidades por cc. para as intramusculares ou subcutâneas e 200 cc. de água morna com 1 000 unidades para emprêgo oral ou retal.

No Barnes Hospital, o tratamento de uma pneumonia com derrame pleural, foi feito com injeções intravenosas de 10 000 unidades Florey diluídas em 500 cc. de solução a 5 % de glicose, diàriamente durante 5 dias. O emprêgo de 10 000 unidades por via intramuscular foi feito em um caso de septicemia pelo estafilococo áureo, resultando negativa a hemocultura no 2.º dia de tratamento. Numa osteomielite crônica injetavam pelo trajeto fistuloso 10 000 unidades em solução glicosada, diàriamente.

No tratamento de fraturas expostas infetadas, em soldados vindos das frentes do Pacífico, os resultados foram espetaculares. A penicilina não influiu na recalcificação e as radiografias de osteomielites revelaram rarefações que, entretanto, não eram dependentes de uma deficiência de calcificação, mas sim do desaparecimento dos germes infetantes.

Florey e Florey (37) aconselham, em coleções purulentas, fechar a cavidade em que se instilou penicilina, evacuando o exudato periòdicamente se necessário.

Herrel, Cook e Thompson (47), em maio de 1943, publicaram 3 observações de infecções gonocócicas sulfamido-resistentes tratadas com penicilina. Êstes 3 pacientes ficaram curados em 2,5 a 3,5 dias com injeções intravenosas de penicilina, tornando-se negativas as pesquisas do gonococo no sedimento urinário e no líquido prostático de 17 a 48 horas depois de iniciado o tratamento. Posteriormente mais 2 casos de gonorréia sulfamido-resistente foram também tratados com penicilina, dando culturas negativas em 21 a 48 horas. A dose total variou de 70 000 a 100 000 unidades em solução isotônica de cloreto de sódio, dividida em duas frações de 1 litro cada uma com um intervalo de 8 a 10 horas de uma para outra. Inicialmente administração rápida dos primeiros 100 a 200 cc. e depois de 30 a 40 gôtas por minuto.

Segundo uma comunicação que recebemos do Dr. Leonardo Piccoli, Chefe do "Departamento do Serviço Profissional dos Laboratórios Squibb", a penicilina, por sua baixa toxidez, poderia ser dada em doses elevadas inicialmente, com a intenção de se evitar uma possível penicilino-resistência. Sugeriu-se a dosagem de 120 000 U. F. por dia, nos primeiros dois ou três dias, administradas em doses fracionadas, em intervalos de 2 a 3 horas.

O tratamento é usualmente continuado por 7 dias depois de se tornar normal a temperatura, de acôrdo com cada caso. A quantidade total por cada paciente, nas formas graves de infecções, é calculada de 500 000 a 1 milhão de U. F.

Florey examina sistemàticamente o sôro dos doentes, para, dessa maneira, verificar a presença dos organismos e avaliar a quantidade de penicilina que deveria administrar.

A simples observação da temperatura seria um mau guia; entretanto, os exames bacteriológicos e a diminuição da sintomatologia subjetiva, podem constituir um seguro índice de bons resultados. Geralmente a temperatura cai em lise num período de 14 a 20 dias.

Recentemente tivemos uma comunicação de que Mahoney levou ao conhecimento da *Public Health Medical Association*, vários casos de sífilis primária, tratados eficientemente pela penicilina com redução considerável do tempo para negativação das sero-reações e desaparecimento em 16 horas dos treponemas presentes nas lesões sifilíti-

cas. Êste tratamento provisòriamente compreende uma série de 48 injeções de 25 000 unidades cada uma dadas de 4 em 4 horas por via intramuscular, durante 8 dias.

Sendo a sífilis uma infecção crônica por excelência, exigindo longos tratamentos e minuciosas observações, não se poderá portanto concluir algo definitivo, sôbre tão delicada questão, o que sòmente poderá ser feito depois de alguns anos de constante pesquisa em um número razoável de doentes.

Como vemos, a atividade admirável da penicilina oferece o mais vasto campo de aplicação em quase tôdas as formas de infecções, como preventivo e curativo, oferecendo os melhores e mais rápidos resultados, superando os até agora conseguidos com os mais modernos tratamentos presentemente em uso.

No *Journal of the American Medical Association* de 28 de agôsto de 1943, às páginas 1217 e seguintes faz-se a publicação oficial dos resultados obtidos com o emprêgo da penicilina no tratamento de 500 doentes portadores das mais variadas infecções. Êste trabalho: "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" relata 69 reações tóxicas que nunca chegaram a alarmar, desaparecendo espontâneamente. Foram constatados 19 casos de tromboflebites no local das injeções, 14 casos de urticária, 12 casos de elevação térmica, e outros de menor importância. Dêsses 500 doentes tratados 366 curaram ou obtiveram grandes melhoras, 94 morreram e em 40 não foram observados resultados. Nas infecções gonocócicas sulfamidoresistentes a percentagem de cura foi de 100 %. De 91 septicemias por *Staphylococcus* 54 curaram; de 137 infecções estafilococicas simples obtiveram 109 curas ou melhoras. De 76 pneumonias 45 curaram e de 17 endocardites bacterianas subagudas apenas 3 melhoraram.

ESTUDO EXPERIMENTAL ELETROCARDIOGRÁFICO DAS INJEÇÕES INTRAVENOSAS DE PENICILINA

No estudo farmacodinâmico de qualquer substância, a eletrocardiografia ocupa um lugar de grande destaque na avaliação dos efeitos sôbre a fibra muscular cardíaca, diretamente, ou sôbre o complexo funcional da contratilidade do miocárdio. O ataque de uma substância ao protoplasma celular, desencadeia fenômenos físico-químicos com repercussão no metabolismo íntimo dos tecidos, provocando estados farmacodinâmicos ou tóxicos, muitas vêzes dificilmente evidenciáveis aos métodos gerais de pesquisa biológica.

O uso intravenoso de drogas, por seu primeiro contato com a corrente circulatória, iria imediatamente influir sôbre o coração, e a análise cardiográfica simples, a oncometria e a quimografia nos forneceriam um subsídio valioso para o seu estudo, porém, em face de uma substância como a penicilina, é imprescindível que se recorra a processos mais acurados, capazes de nos revelar o comprometimento ou não da função do músculo cardíaco. Achamos na elétrocardiografia um processo ideal que completa as condições do nosso estudo e que, sem dúvida, contribuirá para esclarecer muitos fatos, uma vez que não encontramos na bibliografia que consultamos nenhum estudo referente à ação da penicilina, em relação aos fenômenos físico-químicos da contração cardíaca.

Não poderíamos fugir, portanto, à verificação experimental desta questão, considerando que é sabido que grande número de cogumelos tem a propriedade de elaborar substâncias tóxicas de ação geral sôbre o aparelho circulatório, e considerando também que alguns autores observaram uma

relativa influência da penicilina no número de batimentos cardíacos.

Como em tôdas as pesquisas desta natureza, defrontaram-se inicialmente grandes dificuldades. Em primeiro lugar não dispúnhamos de penicilina e era impossível adquiri-la. Iniciamos, então, à custa de maiores sacrifícios, as nossas culturas de *Penicillium,* conseguindo obter, trabalhosamente, quantidades de penicilina ativa que bastassem às nossas experiências.

Considerando que o emprêgo dos diversos sais de penicilina poderiam ter influência nos nossos resultados finais, resolvemos trabalhar apenas com o ácido penicílico purificado.

Dentre os animais de experimentação, escolhemos o coelho por ser de porte pequeno, extremamente sensível às substâncias de ação predominantemente cardíaca, favorecendo destarte um fácil manejo e regular economia da penicilina empregada.

Para obtermos completa imobilidade dêsses animais, recorremos à anestesia pelo éter, por ser êste anestésico o que determina menores modificações nos traçados eletrocardiográficos. Feita uma anestesia quase sempre superficial, por inalação descontínua, obtivemos eletrocardiogramas com variações dependentes não só da anestesia como também características de contrações musculares do animal.

Algumas vêzes levamos esta anestesia a um grau tal que determinasse um estado sincopal. A síncope determinada pelo éter raras vêzes é mortal, uma vez suspensa imediatamente a anestesia, por ser uma síncope respiratória dependente, na maior parte dos casos, de uma inibição conseqüente à inalação dos vapores de éter. Esta síncope, entretanto, como verificamos em alguns dos nossos eletrocardiogramas, determina alterações dos traçados que demonstram o sofrimento das fibras do miocárdio, muito provàvelmente uma isquemia caracterizada pela inversão da onda *T* que, em casos mais graves, pode apresentar as características de uma onda coronariana.

Em outros casos, vencendo a resistência natural e a inquietação dos animais, conseguimos eletrocardiogramas sem anestesia.

Por todos êstes obstáculos, com escassez de material eletrocardiográfico, oriunda do estado de guerra que atravessamos, realizamos um número limitado de observações, que bastam, entretanto, para confirmações concludentes.

Em tôdas as nossas experiências trabalhamos com um eletrocardiógrafo Siemens, tendo colocado os eletródios na raiz dos membros superiores e na base do hemitórax E., por intermédio de agulhas especiais, logo abaixo da pele, em pleno tecido subcutâneo. Como poderemos ver, as quantidades empregadas foram sempre grandemente elevadas, superando de muito as doses normais.

Nestas condições relacionamos o estudo eletrocardiográfico feito em 16 coelhos, na seguinte ordem:

Coelho n.º 1: 1 600 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 10 cc. de água destilada na veia marginal da orelha.

Coelho n.º 2: 1 500 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 10 cc. de penicilina, correspondendo a 400 U. F. mais ou menos, por via venosa. Tratamento durante 3 dias, com 300 U. F. diárias, por via intravenosa. 10 horas depois da última dose tiramos o 3.º eletrocardiograma.

Coelho n.º 3: 1 550 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma imediatamente depois da injeção intravenosa de 400 U. F. de penicilina, contidas em 12 cc. Após 10 minutos tiramos o

3.º eletrocardiograma. Mais 3 dias de tratamento com 300 U. F. diárias de penicilina, após o que tiramos o

4.º eletrocardiograma, 10 horas depois da última injeção.

Coelho n.º 4: 1 600 gramas de pêso. Anestesia pelo éter. Observação incomple-

ta por se nos ter velado o filme dos eletrocardiogramas iniciais.

Eletrocardiograma feito depois de receber êste coelho, uma dose total média de 1 300 U. F. de penicilina, por via intravenosa, durante 4 dias.

Coelho n.º 5: 1 100 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. na veia marginal da orelha. Fizemos durante 3 dias, 200 U. F. diárias, de penicilina, na veia marginal. Decorridas 10 horas da última injeção, tiramos o

3.º eletrocardiograma.

Coelho n.º 6: 1 950 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 600 U. F. de penicilina por via venosa. Durante 3 dias fizemos 400 U. F. diárias, tirando o

3.º eletrocardiograma 10 horas depois da última dose.

Coelho n.º 7: 1 200 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. por via venosa. Durante 3 dias, 200 U. F. diárias, intravenosas, de penicilina. 10 horas depois da última dose obtivemos o

3.º eletrocardiograma.

Coelho n.º 8: 1 550 gramas de pêso Anestesia pelo éter.

1.º eletrocardiograma antes e

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. na veia marginal da orelha. Três dias de tratamento com 300 U. F. diárias de penicilina, sendo que tiramos o

3.º eletrocardiograma 10 horas depois da última injeção.

Coelho n.º 9: 1 600 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. na veia marginal da orelha. Tratamento durante 3 dias com 300 U. F. diárias de penicilina. Tirando o

3.º eletrocardiograma 10 horas após a última injeção.

Coelho n.º 10: 1 000 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 300 U. F. na veia marginal.

Coelho n.º 11: 1 650 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. de penicilina, feita na veia marginal da orelha.

Coelho n.º 12: 1 900 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 400 U. F. na veia marginal da orelha.

Coelho n.º 13: 900 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 1 700 U. F., mais ou menos, de penicilina, na veia, em 20 cc. feitos vagarosamente.

Coelho n.º 14: 800 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 1 000 U. F. mais ou menos em 10 cc. de penicilina, por via venosa.

Coelho n.º 15: 1 000 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 1 500 U. F. em 15 cc. de penicilina, mais ou menos, na veia.

Coelho n.º 16: 950 gramas de pêso. Normal.

1.º eletrocardiograma normal.

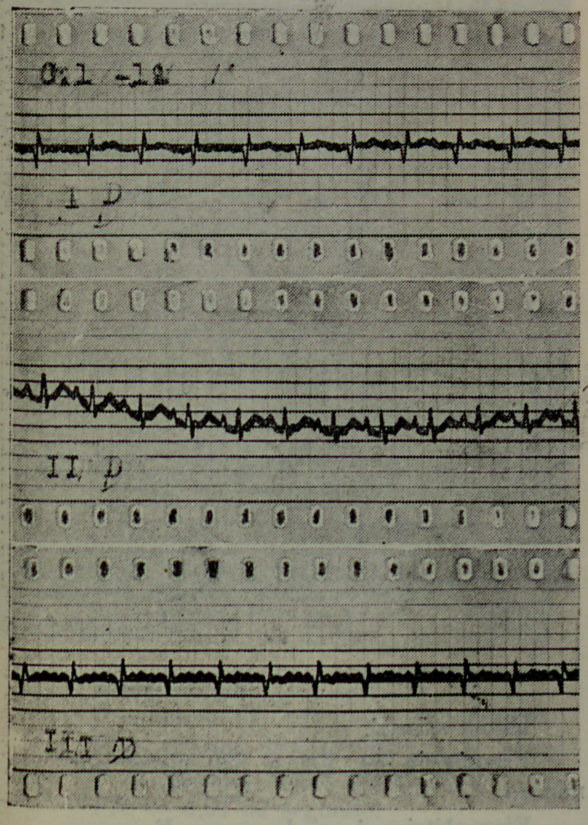
2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 1 500 U. F. aproximadas em 15 cc. de penicilina, na veia.

Verificamos, assim, a ação da penicilina em doses altas, muito superiores às doses úteis normais, por vez, por dia e por quilo de pêso de animal, em organismos intoxicados já por um anestésico e em organismos sãos, normais, mantidos, todavia, nas mesmas condições de ambiente.

Coelho n.º 1:

1 600 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

Êste animal, logo após ter sido anestesiado pelo éter, apresentou-nos o seguinte eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 290 a 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a E.

P — positivas nas 3 derivações.

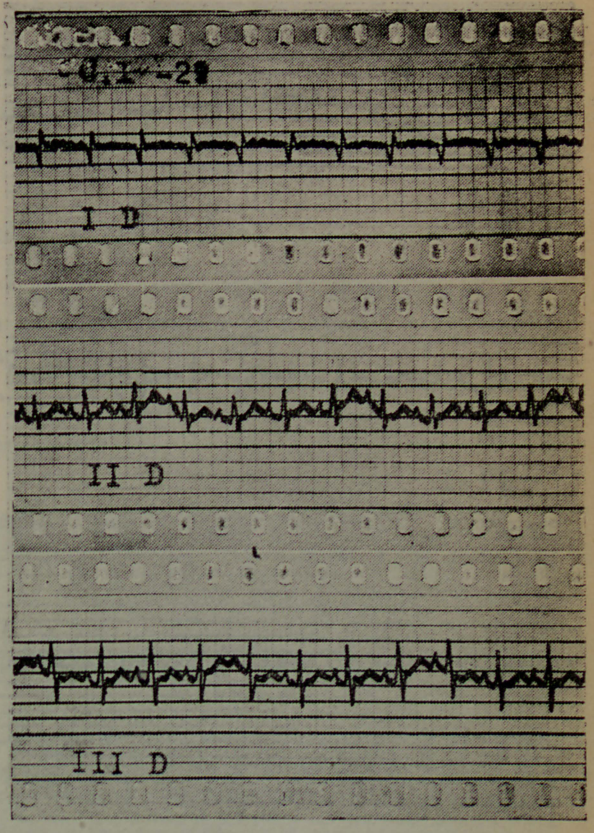
PR — 0,07 de segundo.

QRS — duração de 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

ST — muito acentuada em D_2.

T — positiva nas 3 derivações.

Depois de decorridos 5 minutos da injeção de 10 cc. de água destilada na veia marginal da orelha, tiramos o 2.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 310 a 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a E.

P — positiva nas 3 derivações mais acentuada em D_2 e D_3.

PR — 0,05 a 0,07 de segundo.

QRS — duração de 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

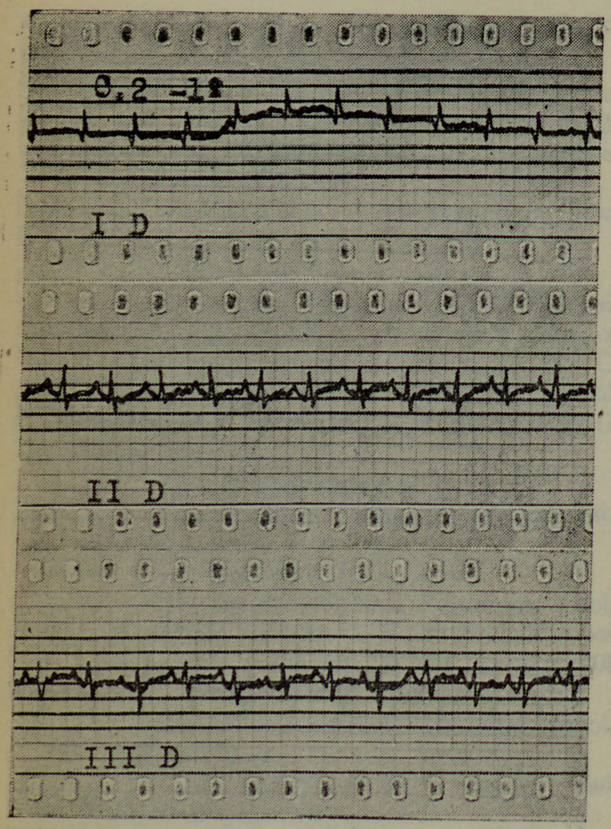
ST — nivelada nas 3 derivações.

T — de baixa voltagem em D_1. Alta em D_2 e D_3.

Coelho n.º 2:

1 500 gramas. Anestesia pelo éter.

Após uma leve anestesia tiramos o primeiro traçado eletrocardiográfico:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 310 a 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

P — positiva nas 3 derivações.

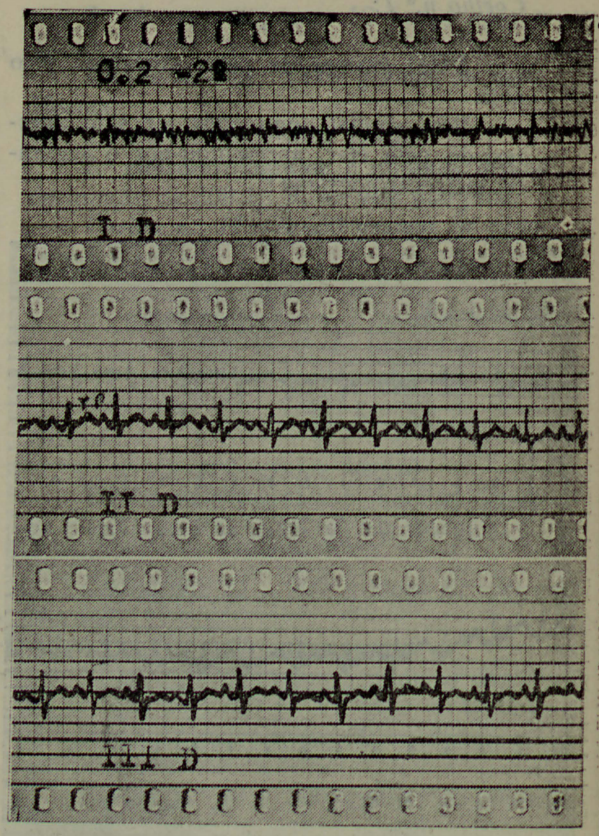
PR — 0,05 de segundo

QRS — 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — isolétrica.

Injetamos então 400 U. F. de penicilina na veia marginal da orelha dêste coelho e 5 minutos depois obtivemos o 2.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 305 a 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a E.

P — positiva nas três derivações.

PR — 0,05 de segundo.

QRS — duração de 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

ST — nivelado em D_2 e D_3.

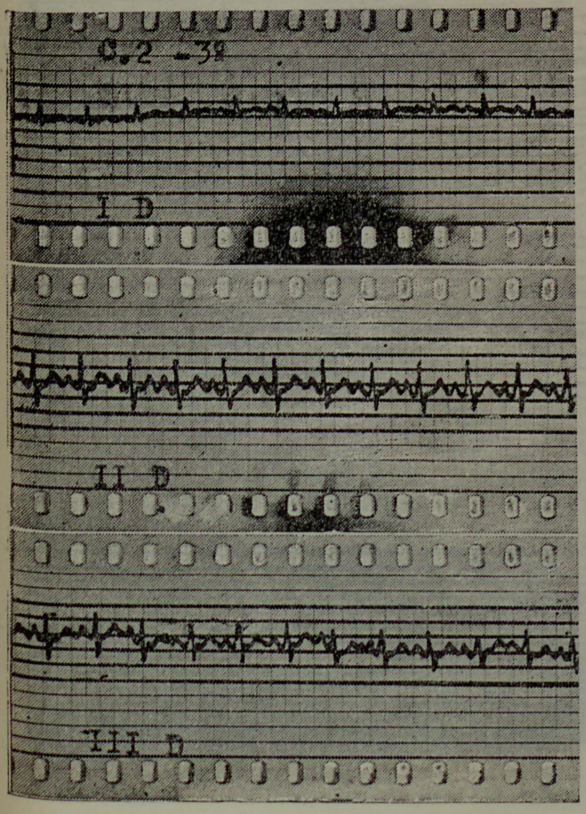
T — positiva.

O traçado em D_1 está em más condições devido às contrações musculares do animal, quando tirávamos o eletrocardiograma.

Durante três dias tratamos êste coelho com 300 U. F. diárias por via intravenosa, tendo feito um total de 1 300 U. F., sendo

o 3.º eletrocardiograma.

que 10 horas após à última injeção tiramos



Ritmo sinusal.

Freqüência de 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a E.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,04 de segundo.

QRS — 0,015 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações, mais acentuada em D_2.

ST — acentuada em D_2 e D_3. Normal em D_1.

T — plana em D_1 e de boa amplitude nas outras.

Coelho n.º 3:

Pesando 1 550 gramas. Anestesia pelo éter.

Anestesiado êste coelho tiramos o 1.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência variável de 280 a 320 ciclos por minuto. Êste animal no início da retirada dêste eletrocardiograma apresentou tendência a uma síncope respiratória, provàvelmente de inibição, o que aliás é muito freqüente nos coelhos. Foi nesse estado que apanhamos a D_2.

Eixo com tendência para a E.

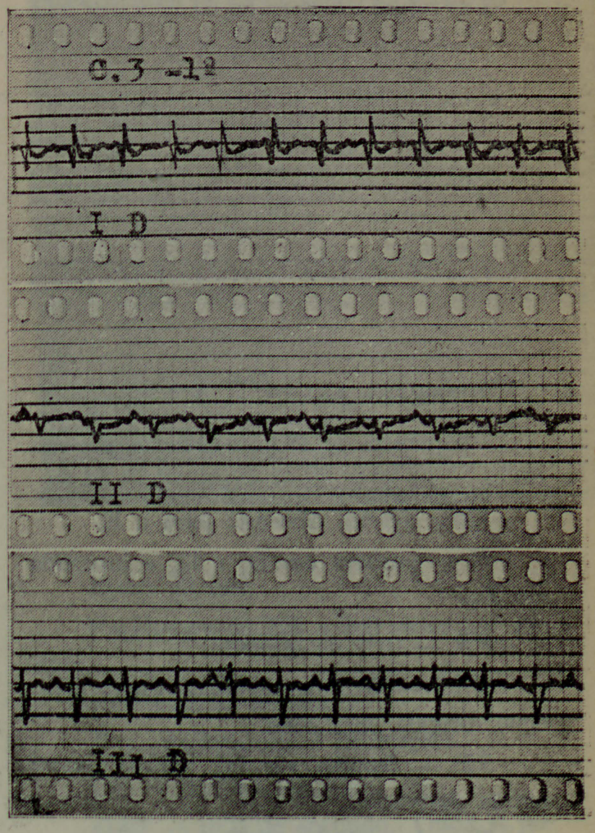
P — positiva em D_2 e D_3. Levemente achatada em D_1.

PR — 0,06 de segundo.

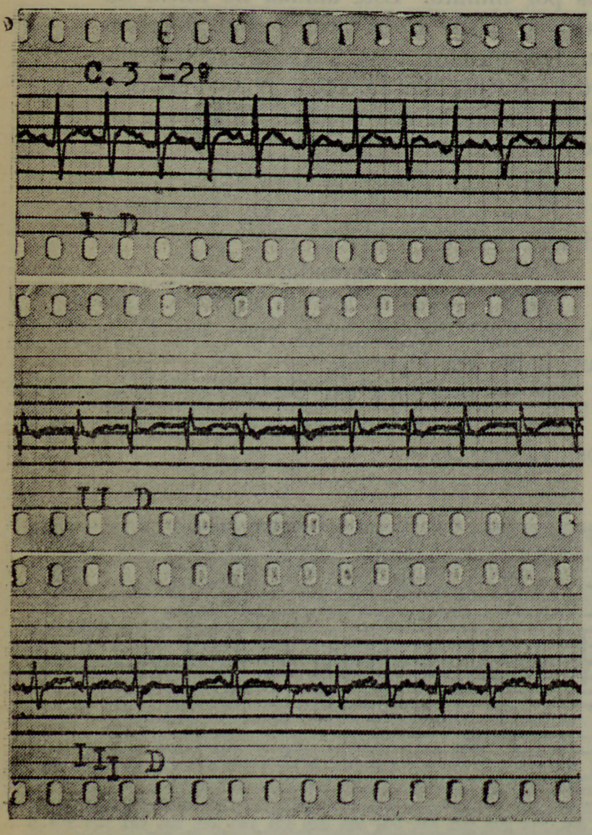
QRS — 0,03 a 0,05 de segundo. Onda principal dirigida para cima em D_1 e para baixo em D_2 e D_3.

S^T — profunda em D_3.

T — invertida em D_1, plana em D_2, positiva em D_3.



Imediatamente depois da injeção de 400 U. F. contidas em 12 cc. de penicilina, feita na veia marginal da orelha, tiramos o 2.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 280 a 310 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a E.

P — positiva em D_1 e D_2 e invertida em D_3.

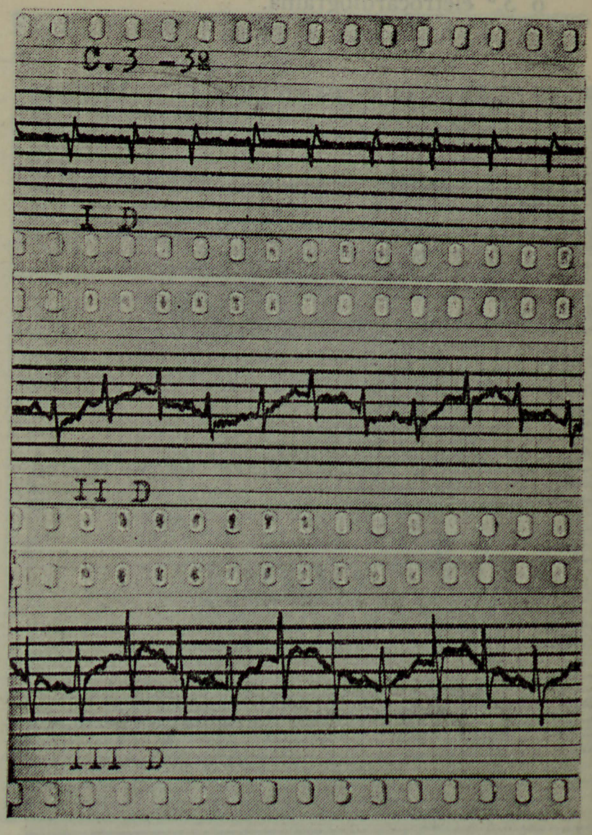
PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima.

ST — Rombo em D_1. Agudo nas 2 outras derivações.

T — invertida na D_2.

Esperamos mais 10 minutos, durante os quais interrompemos a anestesia, e tiramos o 3.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 260 a 310 ciclos por minuto.

Eixo elétrico tendendo para D.

P — positiva em D_2 e D_3. Achatada em D_1.

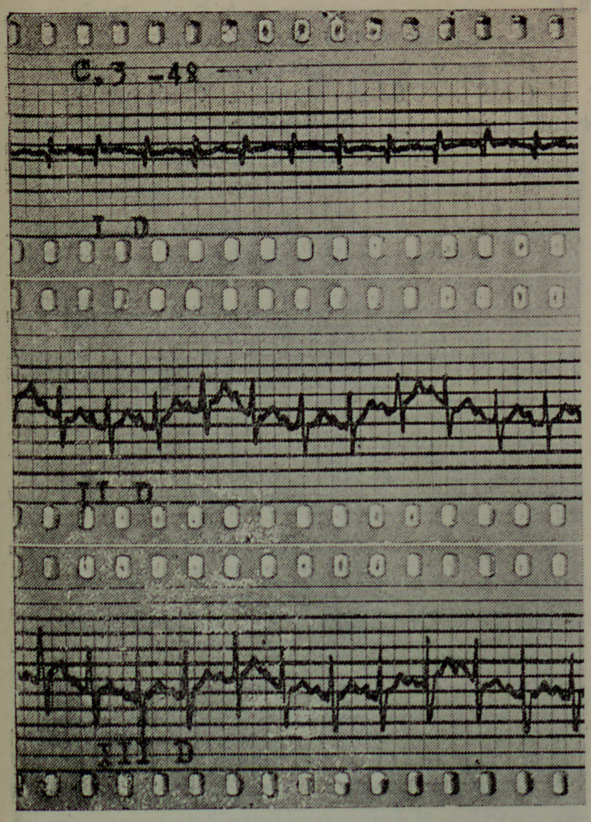
PR — de 0,04 a 0,06 de segundo.

QRS — de 0,02 de segundo. Onda principal dirigida para cima.

T — plana em D_1

Êste traçado está em parte prejudicado pelos movimentos do coelho que já estava saindo da anestesia.

Submetemos êste animal ao tratamento durante 3 dias, com doses diárias de 300 U. F. por via intravenosa, num total de 1.300 U. F. sendo que 10 horas após a última injeção tiramos o 4.º eletrocardiograma, sob anestesia etérea:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,04 de segundo. Onda principal dirigida para cima.

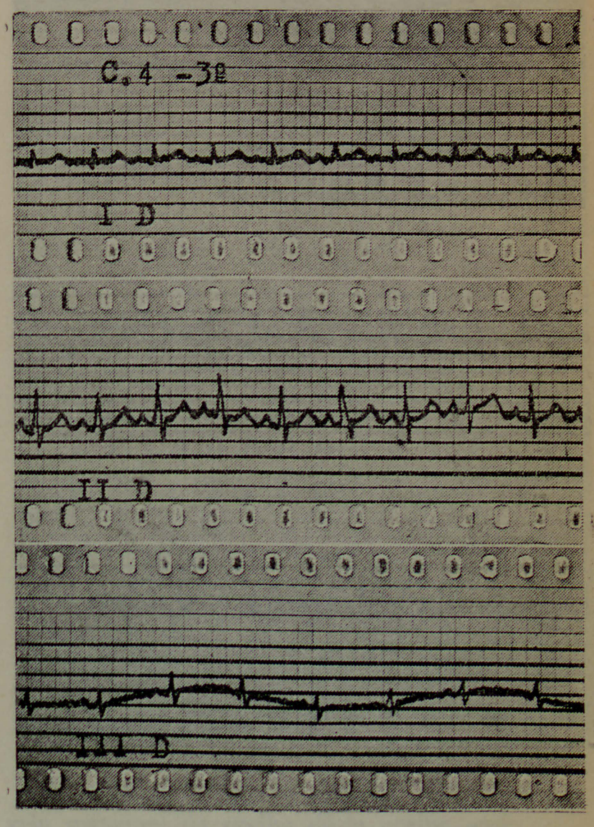
ST — muito acentuado em D_2. e em D_3.

T — positiva em tôdas as derivações.

Coelho n.º 4:

1 600 gramas de pêso, anestesiado pelo éter.

Por fatalidade foram velados os 2 primeiros eletrocardiogramas dêste coelho, tirados nas mesmas condições que os dos coelhos anteriores. Entretanto obtivemos um bom eletrocardiograma depois de 4 dias em que fizemos 300 U. F. diárias, numa dose total de 1 300 unidades por via venosa e 10 horas após a última injeção.



Ritmo sinusal.

Freqüência de 220 a 260 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

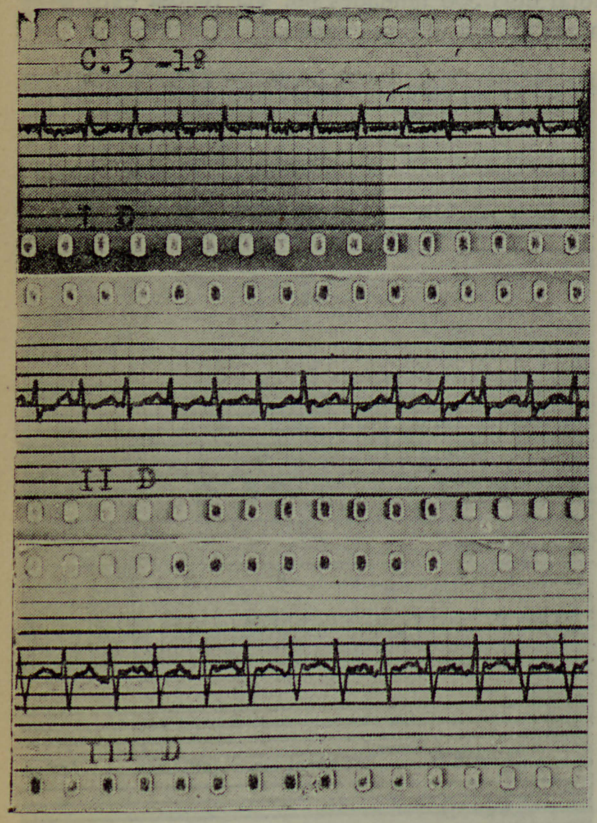
ST — perfeitamente nivelado nas 3 derivações.

T — positiva em D_1 e D_2. Quase plana em D_3.

Coelho n.º 5:

1 100 gramas de pêso, anestesiado pelo éter.

Depois de já estar anestesiado tiramos o 1.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 350 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva em D_1 e D_3, negativa em D_2.

O segundo eletrocardiograma foi obtido 5 minutos depois de administradas cêrca de 400 U. F. de penicilina por via venosa:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 340 a 360 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

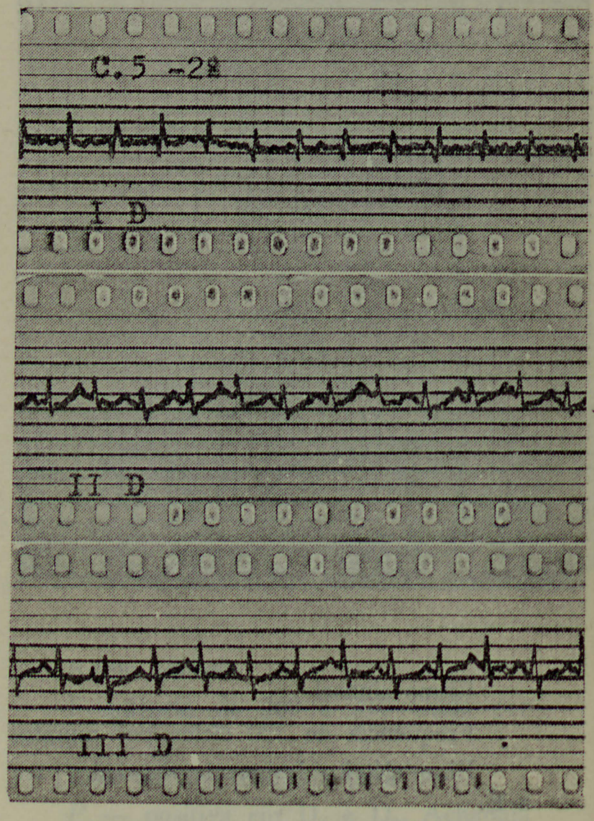
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda principal positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva em D_2 e em D_3.



Recebeu êste coelho diàriamente 200 U. F. de penicilina por via intravenosa, durante 3 dias. Contando a 1.ª injeção fizemos um total de 1 000 U. F., sendo que 10 horas depois da última dose tiramos o 3.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 290 a 330 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

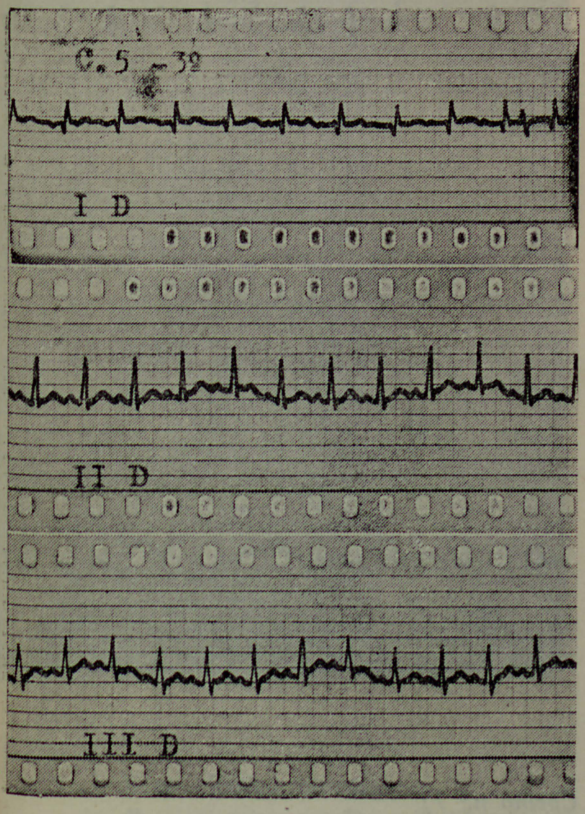
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

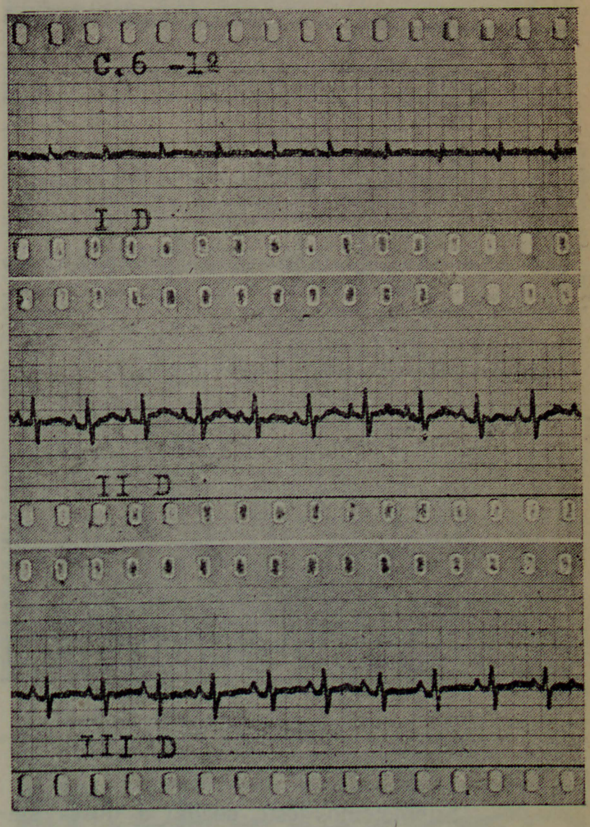
ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações.



T — positiva em D_1 e em D_2, plana em D_3.

Tiramos o 2.º eletrocardiograma 5 minutos depois da injeção de 600 U. F. na



Coelho n.º 6:

1 950 gramas de pêso, anestesiado pelo éter.

Após anestesia tiramos o 1.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 280 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

veia marginal da orelha dêste coelho, cujo aspecto é o seguinte:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 245 a 250 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

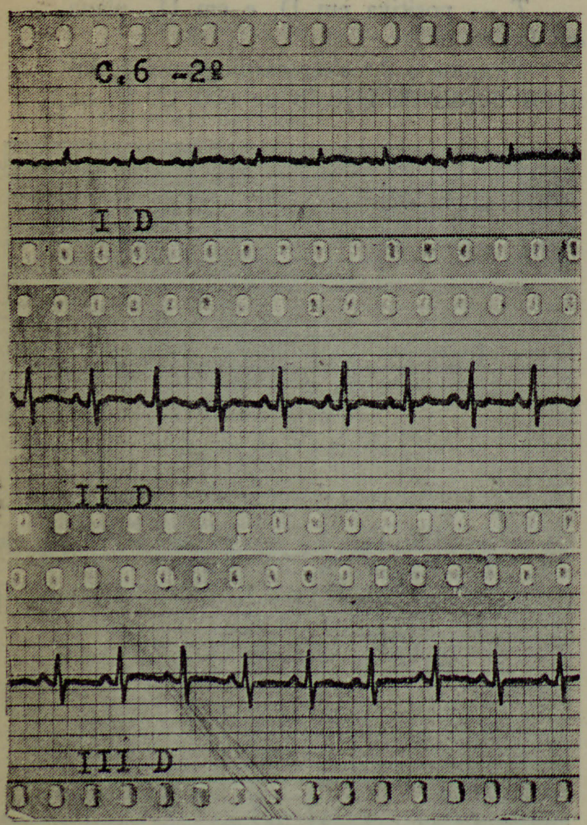
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva em D_1 e em D_2, quase plana em D_3.



Submetemos êste coelho a doses diárias de 400 U. F. de penicilina, tendo feito 1 800 U. F. no fim de 4 dias, sendo que 10 horas depois da última dose tiramos o 3.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 330 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

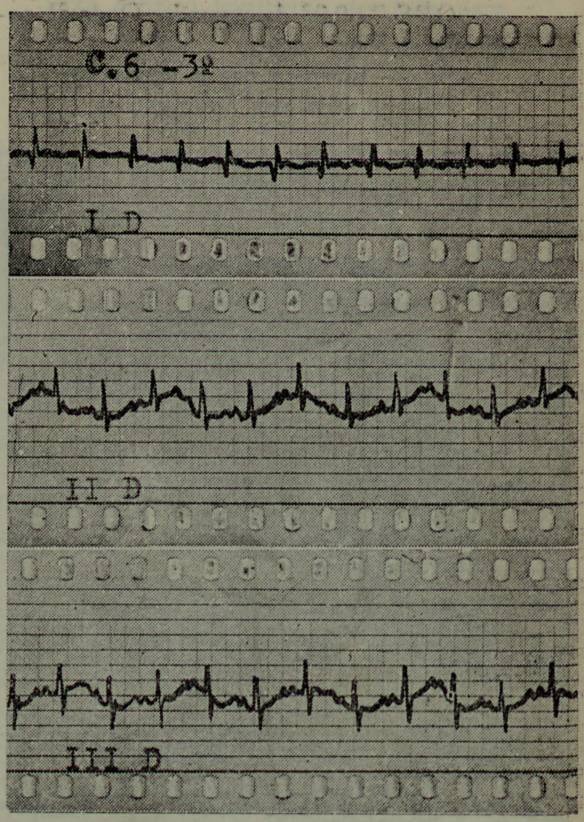
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

ST — isolétrico.

T — invertida em D_1. Positiva em D_2 e em D_3.



Coelho n.º 7:

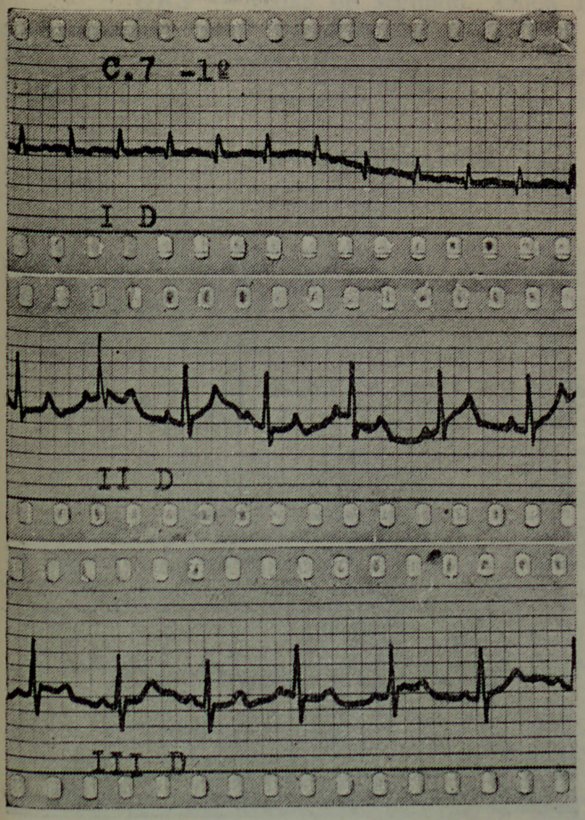
1 200 gramas de pêso, anestesiado pelo éter.

O 1.º eletrocardiograma foi tirado assim que entrou o animal em anestesia.

Ritmo sinusal.

Freqüência de 190 a 310 ciclos por minuto.

Durante a obtenção dêste eletrocardiograma, o coelho apresentou uma inibição respiratória, com tendência a síncope. Êste fato explicaria a diferença no número de batimentos cardíacos, observada nas três derivações.



Eixo elétrico normal.

P — positiva em D_2 e D_3. Levemente achatada em D_1.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — achatada em D_1, positiva em D_2 e em D_3.

Para obtermos o 2.º eletrocardiograma, esperamos que se normalizasse a respiração, injetando então na veia marginal 400 U. F. mais ou menos, iniciando o traçado 5 minutos depois.

Ritmo sinusal.

Freqüência de 100 a 150 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

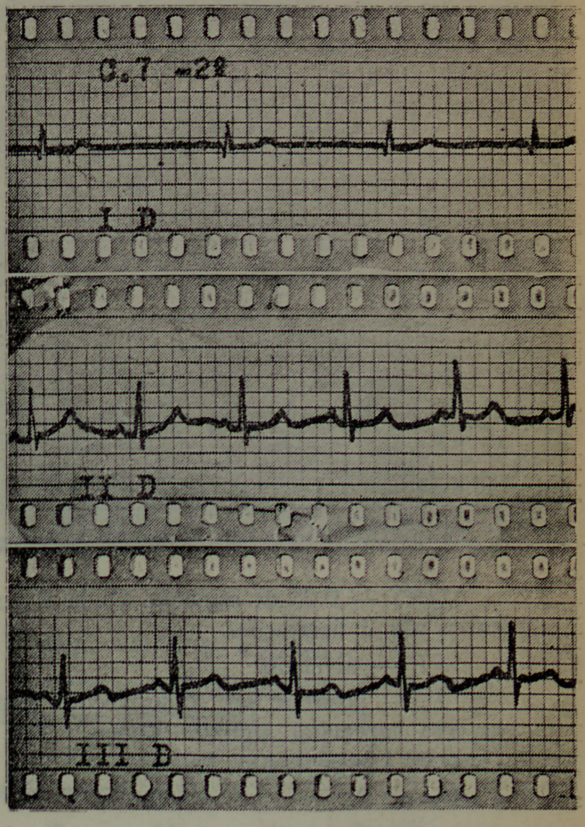
P — achatada em D_1, positiva em D_2 e D_3.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações.



Nos três dias que se seguiram êste coelho recebeu 200 U. F. por dia, na veia marginal. 10 horas depois da última injeção tiramos o 3.º eletrocardiograma.

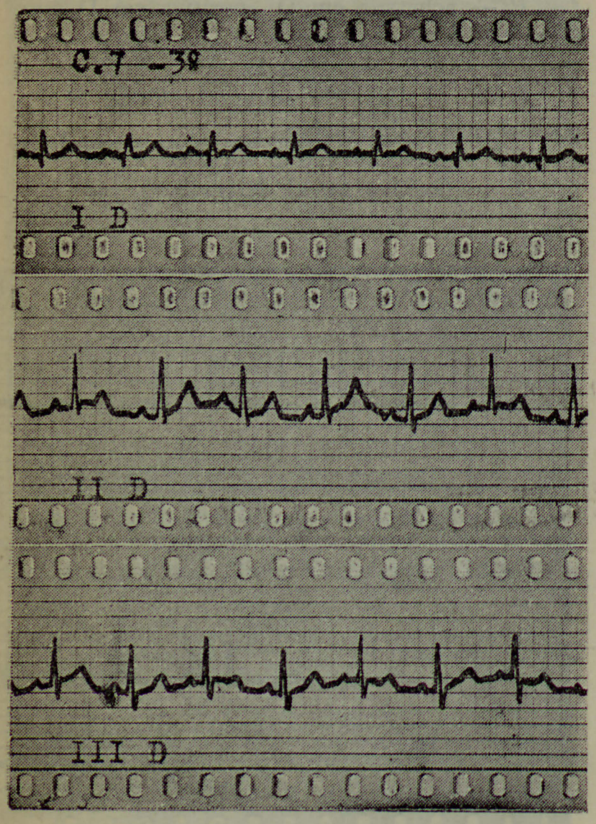
Ritmo sinusal.

Freqüência de 195 a 200 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.



QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações, com aspecto supervital segundo Boden.

Coelho n.º 8:

1 550 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

Submetendo êste coelho à ação dos vapores de éter, obtivemos uma anestesia superficial, tirando então o 1.º eletrocardiograma:

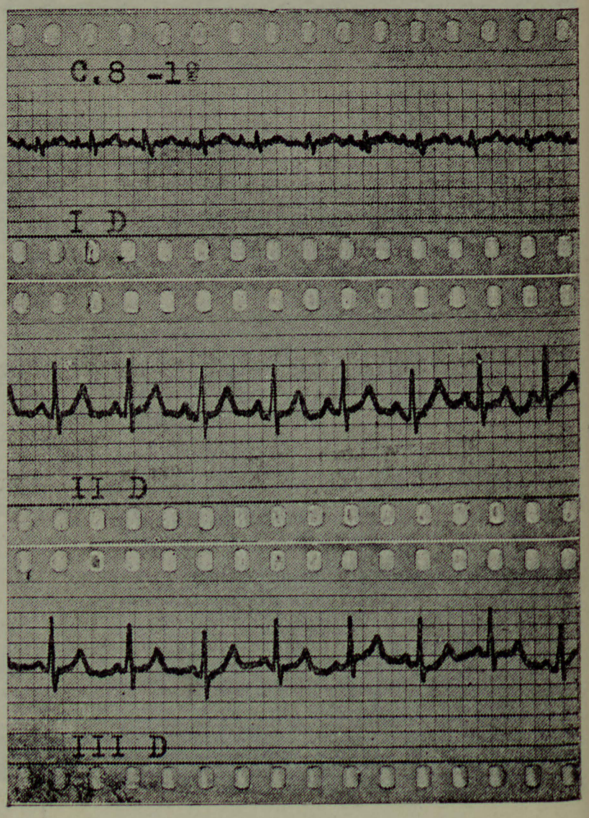
Ritmo sinusal.

Freqüência de 220 a 290 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.



QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações.

Decorridos 5 minutos da administração de 400 U. F. de penicilina, por via intravenosa, tiramos o 2.º eletrocardiograma.

Ritmo sinusal.

Freqüência de 60 a 200 ciclos por segundo. Chama a atenção a bradicardia acentuada que se observa em D_2 e que depende da maior quantidade de anestésico administrada por estar acordando o coelho. Neste momento apresentou-se, também aqui, uma síncope de inibição respiratória, registada dêste modo pelo traçado.

Eixo elétrico normal.

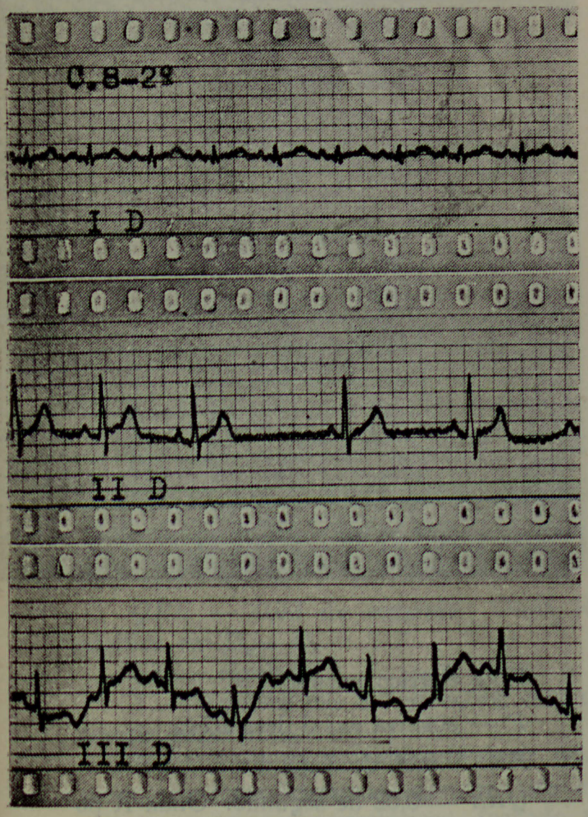
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,025 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — apresenta-se desnivelado no momento da crise de inibição respiratória, isto é, em D_2.

T — positiva nas 3 derivações.



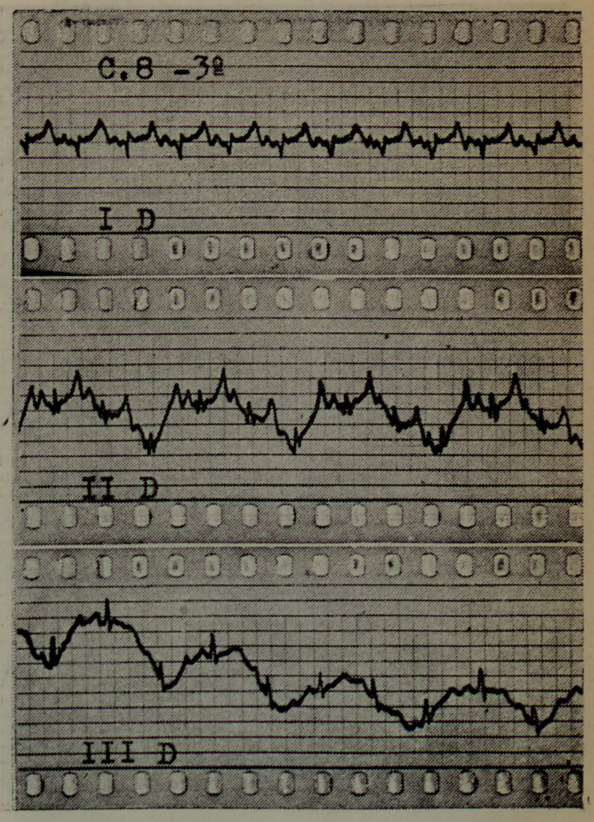
Tratamos êste coelho nos três dias seguintes com uma dose diária de 300 U. F. por via intravenosa. 10 horas depois da última injeção tiramos o 3.º eletrocardiograma:

O aspecto eletrocardiográfico está prejudicado pelas contrações musculares do animal em D_2 e D_3.

Ritmo sinusal.

Freqüência de 290 a 300 ciclos por minuto.

P — positiva nas 3 derivações.



PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

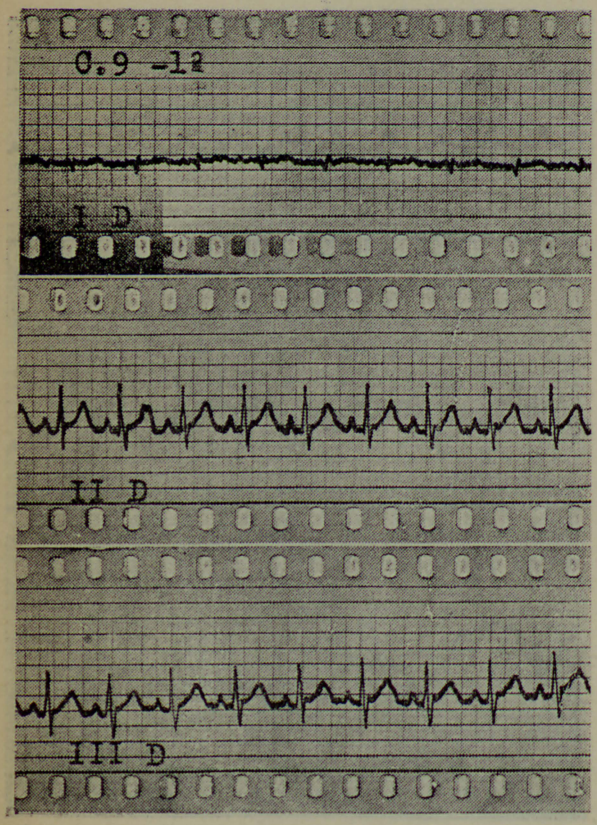
ST — normal; prejudicada a interpretação em D_2 e D_3.

T — positiva nas 3 derivações.

Coelho n.º 9:

1 600 gramas de pêso. Anestesia pelo éter.

Assim que êste coelho entrou em anestesia tiramos o 1.º eletrocardiograma:



Ritmo sinusal.

Freqüência de 250 a 260 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda R positiva em D_2 e D_3.

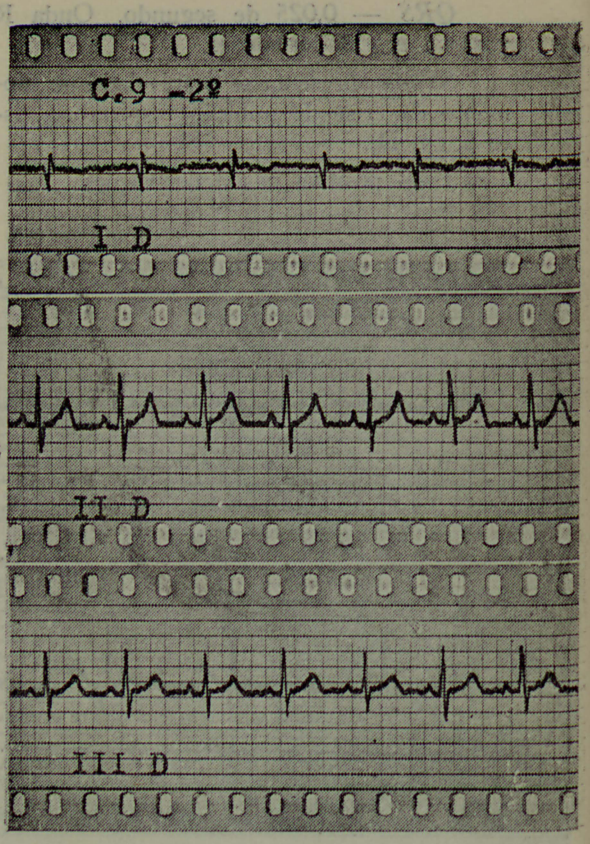
ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações.

Decorridos 5 minutos da injeção de 400 U. F. na veia marginal da orelha, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 167 a 200 ciclos por minuto.



Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — negativa em D_1 e positiva nas 2 outras.

Tratando êste coelho nos três dias subseqüêntes com 300 U. F. diárias, por via intravenosa, obtivemos o 3.º eletrocardiograma 10 horas depois da última injeção:

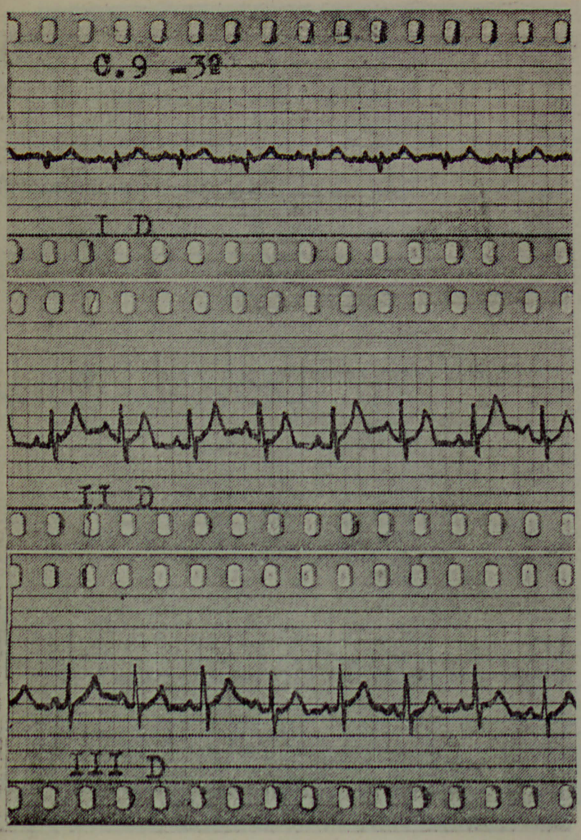
Ritmo sinusal.

Freqüência de 230 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.



QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva em D_2 e D_3.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações, com o aspecto supervital.

Numa série de 7 coelhos tiramos, primeiro, eletrocardiogramas normais, isto é, sem ter empregado anestésicos, fazendo a contensão simples e aproveitando os traçados conseguidos nos momentos em que se conservava mais ou menos imóvel o animal. Os segundos eletrocardiogramas foram tirados depois das injeções de penicilina feitas na veia marginal da orelha. Nestas condições temos:

Coelho n.º 10:

1 000 gramas de pêso. Normal.

Depois de conseguido relativo sossêgo do animal tiramos o eletrocardiograma normal:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 235 a 240 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

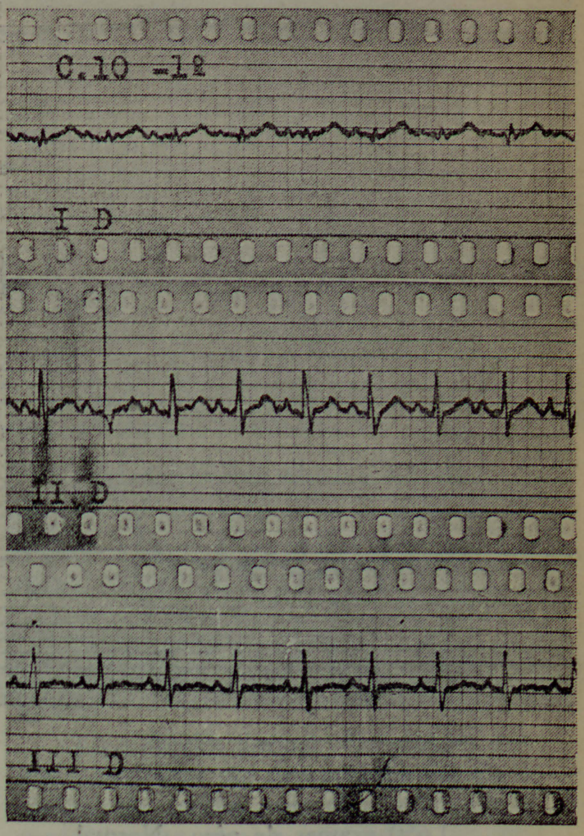
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva em D_1 e em D_3, quase plana em D_3.



Decorridos, então, 5 minutos da injeção de 300 U. F., contidas em 8 cc. de penicilina, mais ou menos, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 190 a 195 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

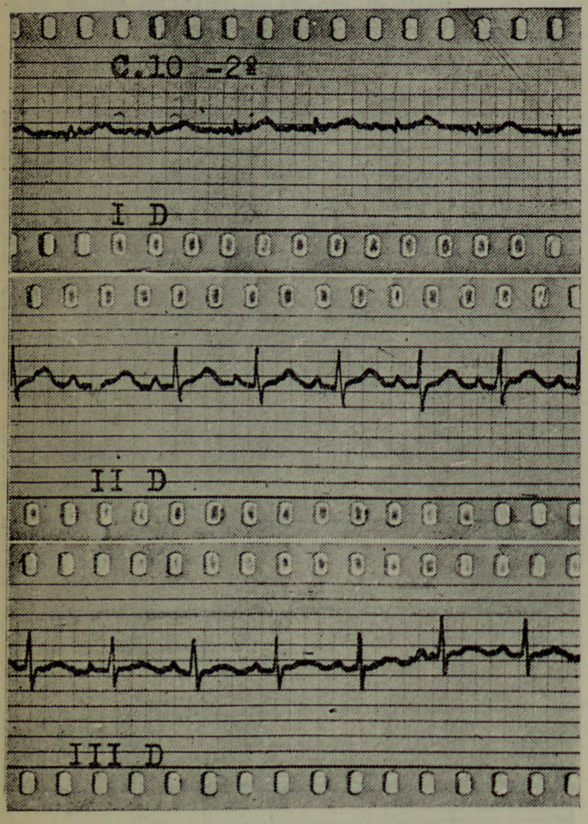
P — positiva em D_2 e em D_3, achatada em D_1

PR — 0,09 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda principal dirigida para cima nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações.



Coelho n.º 11:

1.650 gramas de pêso. Normal.

Obtivemos o 1.º eletrocardiograma, após contensão do animal:

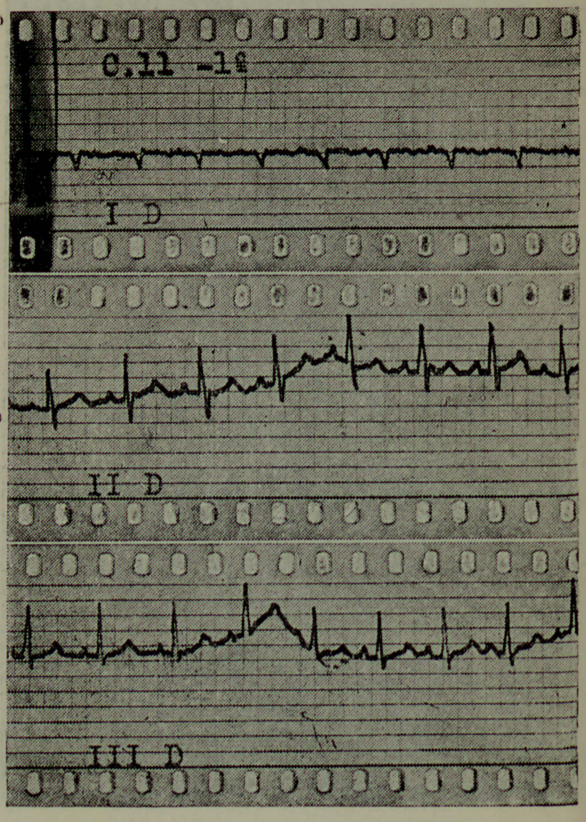
Ritmo sinusal.

Freqüência de 215 a 245 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a D. Em D_2 e em D_3, as contrações e os movimentos musculares do animal, tornam muito irregular o aspecto do eletrocardiograma.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.



QRS — 0,02 de segundo. Onda S preponderante em D_1. R positiva ampla em D_2 e em D_3.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — quase plana em D_1, positiva em D_2 e D_3.

Injetamos a seguir 400 U. F., mais ou menos, na veia marginal da orelha e, decorridos 5 minutos, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Rimo sinusal.

Freqüência de 235 a 240 ciclos por minuto.

Eixo elétrico desviado para a D.

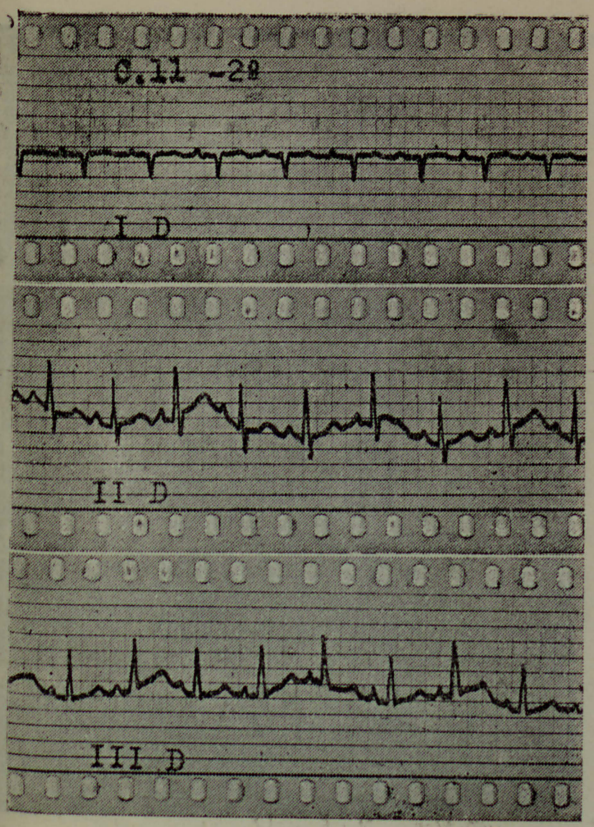
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda S preponderante em D_1. Onda R ampla em D_2 e D_3.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — quase plana em D1 e positivo nas 2 outras.



Coelho n.º 12:

1 900 gramas de pêso. Normal.

Êste coelho comportou-se muito mal, estava muito inquieto, tornando difícil uma boa contensão. Mesmo assim conseguimos tirar o 1.º eletrocardiograma.

Ritmo sinusal.

Freqüência de 220 a 260 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

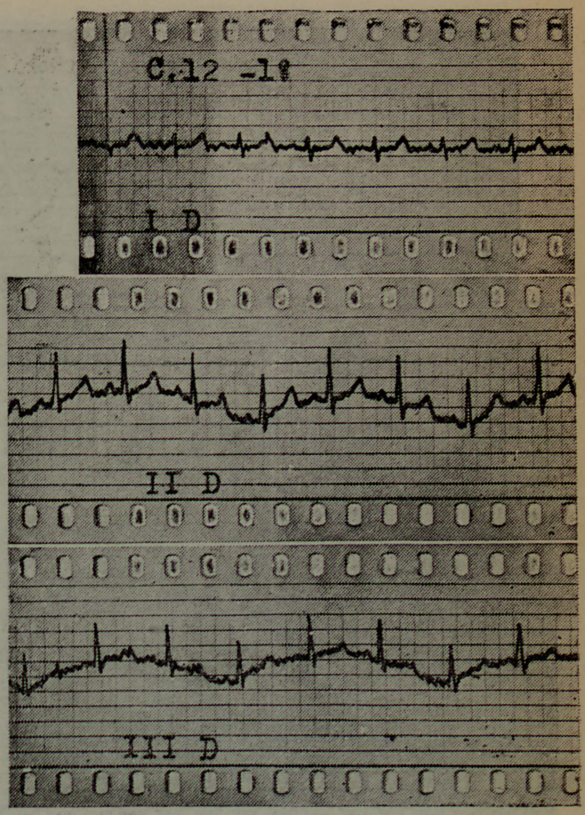
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,025 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações, principalmente em D_2.



Injetamos após, 400 U. F., mais ou menos, de penicilina na veia marginal da orelha, sendo que, decorridos 5 minutos da injeção, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 245 a 250 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal. Os grandes desvios observados são dependentes dos movimentos do coelho, pois não conseguimos, também neste caso, a imobilidade do animal.

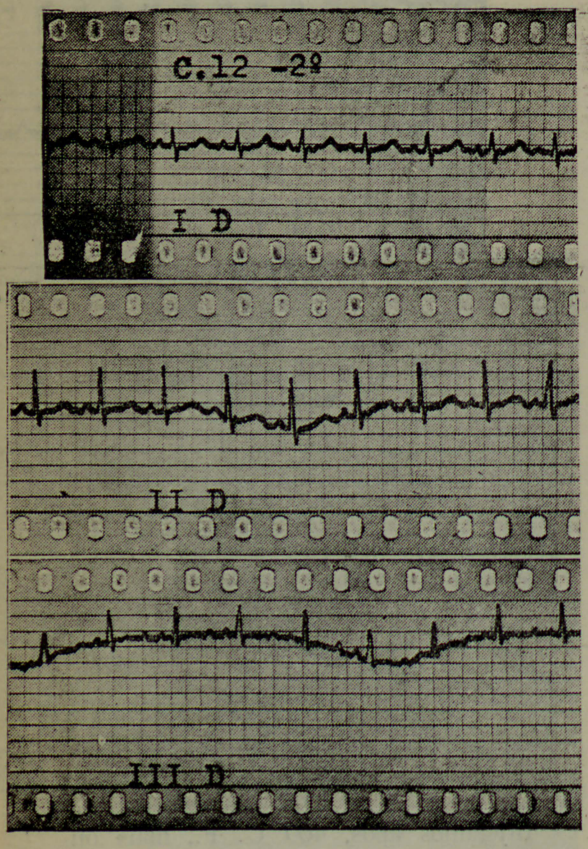
P — positiva nas 3 derivações.

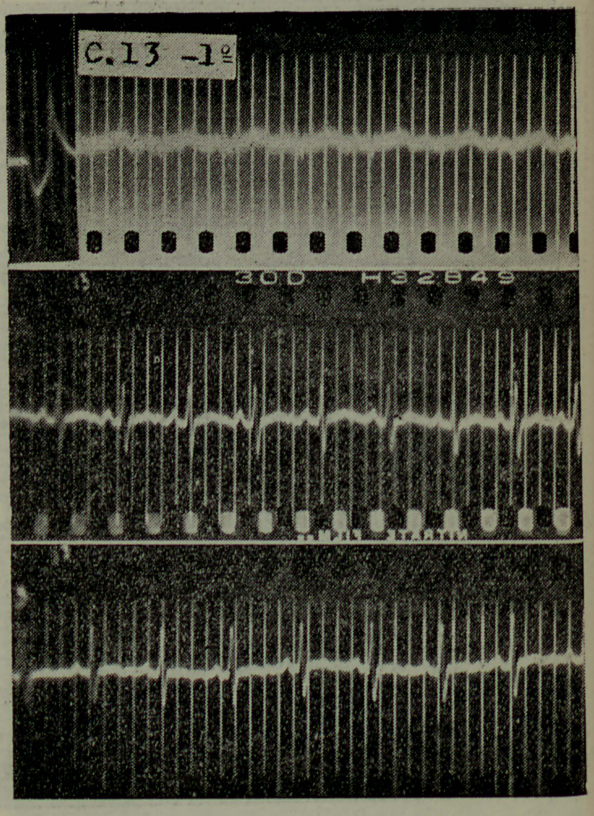
PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado nas 3 derivações.

T — positiva nas 3 derivações, principalmente em D_1.





Coelho n.º 13:

Pêso 900 gramas. Normal.

Após contensão, estando o coelho mais ou menos imóvel, tiramos o

1.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 225 a 240 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações.

Decorridos 5 minutos da injeção intravenosa lenta de 1 700 U. F. contidas em 20 cc. de penicilina, obtivemos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 240 a 255 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

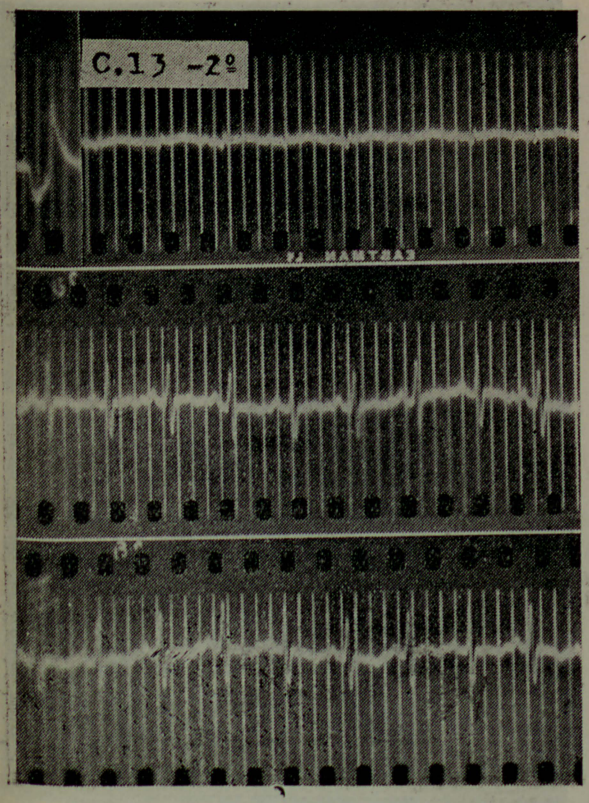
P — positiva nas 3 derivações.

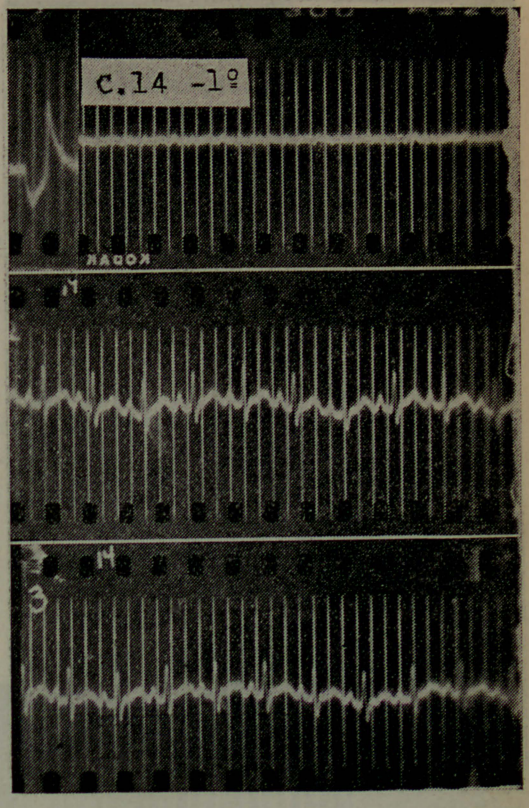
PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva em D_1 e D_2, plana em D_3.





Coelho n.º 14:

800 gramas de pêso. Normal.

Obtivemos o 1.º eletrocardiograma, após contensão do animal:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 310 a 320 por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações. Coração supervital.

Decorridos 5 minutos da injeção intravenosa de 1 000 U. F., contidas em 10 cc. mais ou menos, de penicilina, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 310 a 320 ciclos por minuto.

Eixo elétrico levemente desviado para a E.

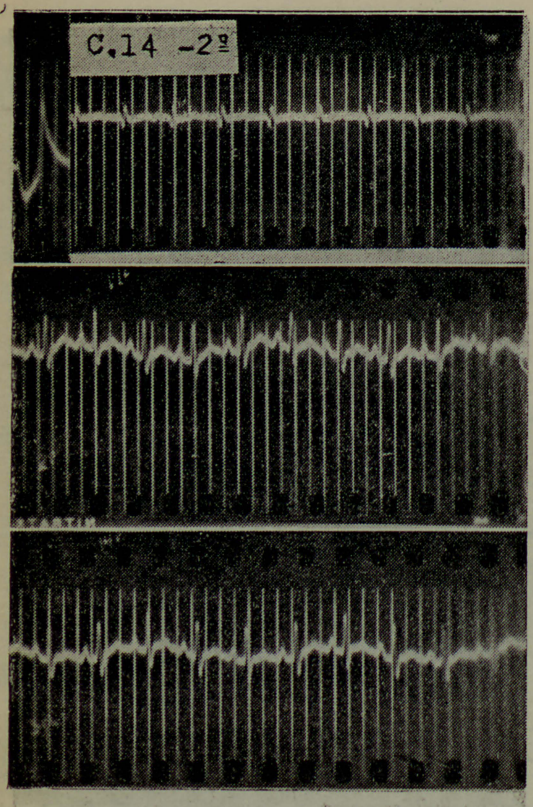
P — positiva nas 3 derivações.

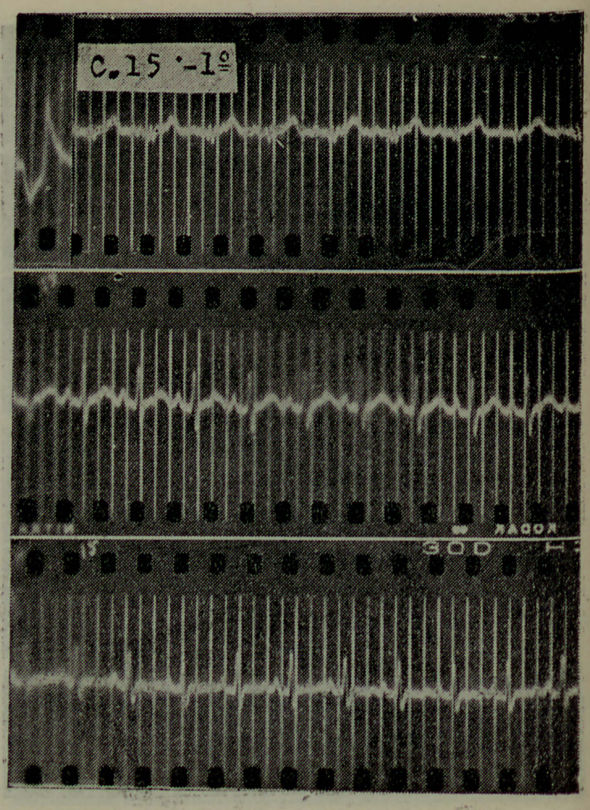
PR — 0,06 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações.





Coelho n.º 15:

1 000 gramas de pêso. Normal.

Obtivemos o 1.º eletrocardiograma, depois de conseguirmos um relativo repouso do animal:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 255 a 280 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva em D_1 e D_2, com tendência a plana em D_3.

Após 5 minutos de injetarmos na veia marginal da orelha, 1 500 U. F., mais ou menos, em 15 cc.. de penicilina, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 290 a 295 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

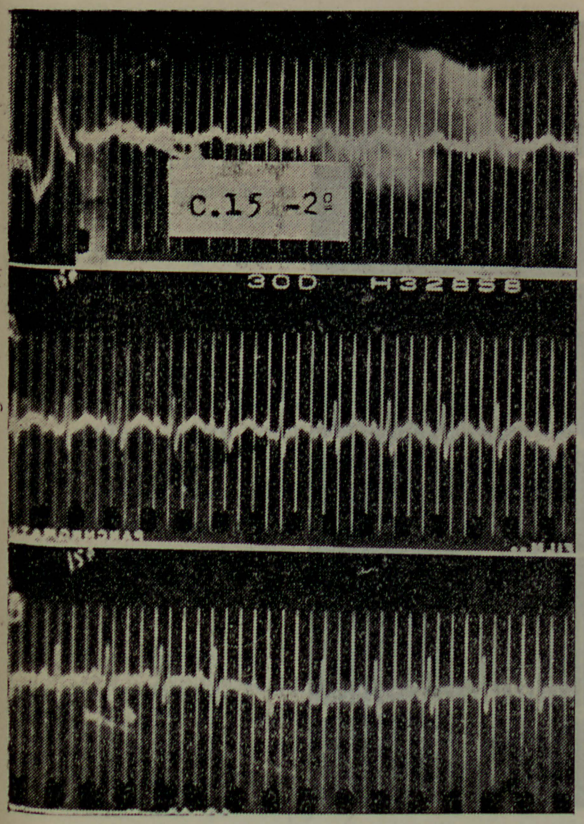
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,07 de segundo.

QRS — 0,02 de segundo.

ST — nivelado.

T — positiva em D_1 e D_2, com tendência a plana em D_3.



A seguir injetamos por via intravenosa, aproximadamente 1 500 U. F., contidas em 15 cc. de penicilina, sendo que, passados 5 minutos, tiramos o 2.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 235 a 240 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

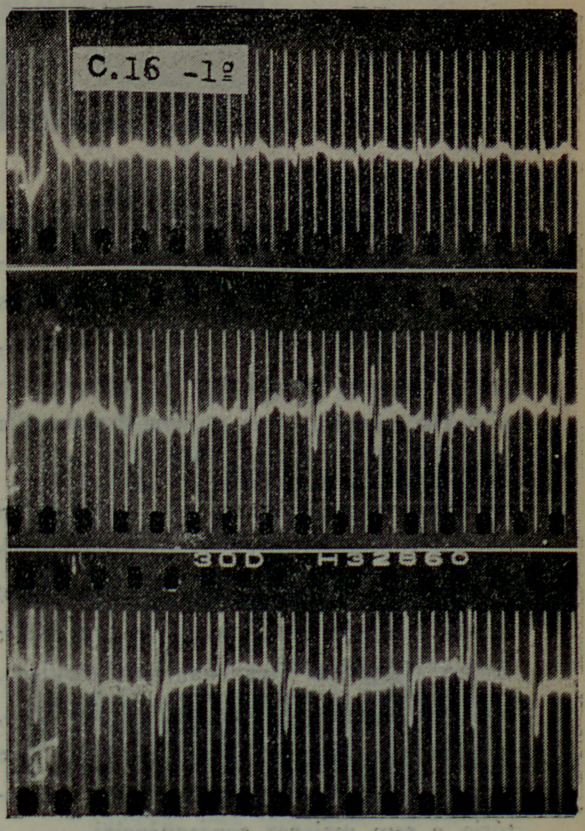
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações.



Coelho n.º 16:

Dificilmente obtivemos uma boa contensão dêste coelho, o que aliás, infelizmente, se traduziu nos traçados. Nestas condições apresentamos o 1.º eletrocardiograma:

Ritmo sinusal.

Freqüência de 250 a 255 ciclos por minuto.

Eixo elétrico normal.

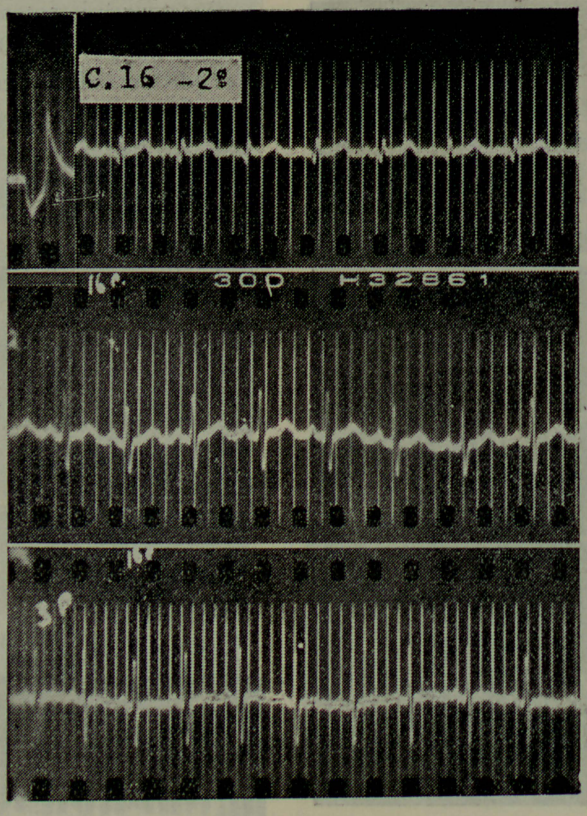
P — positiva nas 3 derivações.

PR — 0,05 de segundo.

QRS — 0,03 de segundo. Onda R positiva nas 3 derivações.

ST — nivelado.

T — positiva nas 3 derivações.



Pela análise dêsses eletrocardiogramas podemos concluir que a freqüência dos ciclos foi relativamente maior nos animais anestesiados do que nos animais normais, exceto durante os acidentes de inibição respiratória, dando lugar a uma bradicardia sinusal.

Após a administração de doses elevadas de substância ativa, tanto nos animais anestesiados como nos não anestesiados, e mesmo naqueles em que havia um sofrimento típico do funcionamento cardíaco, após ou durante a síncopes respiratórias, notamos apenas uma leve bradicardia que nunca foi constante, sendo sempre transitória e sem maiores conseqüências.

Os coelhos que receberam durante vários dias doses elevadas de penicilina, não apresentaram modificações fundamentais de seus eletrocardiogramas em relação aos obtidos antes dêsse tratamento.

Não dependendo, portanto, da ação da penicilina, as discretas modificações eletrocardiográficas nunca foram definitivas, e estamos convictos de que, mesmo com corações doentes cujas lesões sejam mínimas, podemos, sem recio, injetar doses maciças de penicilina, sem que se determinem alterações do trabalho íntimo da fibra miocárdica.

NOTA PRÉVIA SÔBRE OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Realizadas estas provas em animais de experimentação, estando evidente como vimos, a inocuidade da penicilina produzida, transportamos para a clínica as nossas observações, e, constituindo matéria complementar, cujo estudo detalhado oportunamente será feito em colaboração, relatamos aqui alguns casos em que tivemos ocasião de empregar o sal de sódio de penicilina, assim como outros em que empregamos o cogumelo quer sob a sua forma natural, isto é, aproveitando o *Penicillium* retirado das garrafas de cultura, conforme empregou pela primeira vez o Professor Loforte, quer sob a forma de pó obtido segundo a técnica do Dr. Heitor Fábregas, que o tem empregado em veterinária com os melhores resultados.

Usamos também o cogumelo sob a forma de ungüento ou pasta, de mistura com pomada vitaminada, Reclus simples ou vaselina, ou, melhor ainda, com glicerolêo de amido.

Desta forma, observadas as condições em que realizámos o nosso estudo, temos que ressaltar os resultados altamente satisfatórios obtidos, não só em relação à rápida diminuição dos processos infecciosos e à cicatrização em ótimas condições, como também relativamente à parte econômica.

1 — Frederico S. V., 56 anos, viúvo, marítimo, residente nesta capital. Em 18 de dezembro de 1943, apresentou-se à consulta com um abcesso no dorso do pé D, com grande edema que atingia até ao 1/3 inferior da perna. Reação ganglionar inguinal. Sentia fortes dores e dificilmente podia caminhar. Declarou ter sido conseqüência de um ferimento contuso infectado. Drenado todo o pus fizemos um curativo com pasta de *Penicillium*. No outro dia, quando voltou ao consultório, sua primeira declaração foi de que as dores tinham cessado. O edema estava consideràvelmente reduzido e os gânglios inguinais tinham diminuído e não doíam mais. Renovamos o curativo e 2 dias depois a ferida estava completamente limpa, sem secreção purulenta e o fundo se apresentava cheio de granulações. Mais 10 dias e a cicatrização foi completa.

2 — João M. M., 25 anos, casado, operário, branco, residente nesta capital. Em 8 de novembro de 1943 apresentou-se com extenso ferimento infectado ao nível do 1/3 inferior da perna D. Abundante secreção purulenta. Reação ganglionar inguinal D. Fizemos a limpeza do ferimento e colocamos um penso oclusivo com pasta de *Penicillium*. A secreção cessou em 48 horas. Em três dias, com três curativos, a ferida estava completamente limpa. Em 15 dias a cicatrização era completa.

3 — Juvenal S., 56 anos, casado, operário, preto, residente nesta capital. Em 19 de outubro de 1943 apresentava êste doente uma úlcera varicosa infectada ao nível da região maleolar interna da perna D. Tôda a perna era de aspecto erisipelatoso, com intensas dores e caimbras (sic). Como era abundante e fétida a supuração, resolvemos fazer, primeiramente, uma antissepsia. Empregámos a pasta, recobrindo todo o 1/3 inferior da perna. Deixamos êste penso durante 48 horas. A supuração reduziu-se consideràvelmente, as dores acalmaram e o doente já andava melhor. Ao fim de 4 dias a úlcera estava completamente limpa, sendo que a cicatrização se fêz lentamente pela deficiência circulatória do membro varicoso.

4 — Adão F. V., 23 anos, solteiro, operário, misto, residente nesta cidade. Veio à consulta em 16 de fevereiro de 1944. Portador de um ferimento punctório infectado na planta do pé D., sentia grande dificuldade para caminhar e intensas dores. Sentia calafrios e cefaléias. Praticamos o alargamento do ponto de entrada do ferimento e fizemos um curativo com pasta de *Penicillium*. Em três dias desapareciam as dores e em cinco se deu a cura completa.

5 — E. Barc., 24 anos, solteiro, militar, branco, residente nesta cidade. Apresentou-se à consulta em 20 de janeiro de 1944. Antraz coxa E. Forte reação ganglionar inguinal E. Dores intensas dificultavam a marcha. 24 horas depois da 1.ª aplicação de pomada as dores diminuíram, caminhava melhor e o pus drenou fàcilmente. Ao terceiro dia o carnicão soltou-se. Deixamos um penso durante três dias e, quando retirado, mostrou-se a ferida limpa, em início de cicatrização.

6 — Manoel F. S. H., 24 anos, solteiro, operário, branco, residente nesta cidade. Em 13 de dezembro de 1943, apresentou-se à consulta com um grande abcesso por corpo estranho encravado na palma da mão E., com linfangite. Sentia mal-estar e dor de cabeça. Fizemos uma incisão e drenamos, colocando fragmentos do cogumelo no interior da cavidade deixada pelo abcesso, funcionando assim como um dreno. Ràpidamente reduziu-se o processo inflamatório e em apenas 4 dias estava completamente curado.

7 — Necy de L., 22 anos, doméstica, casada, mista, residente à rua M. Dias. Em 19 de outubro de 1943 apresentava uma anexite bilateral, com cervicite, tendo forte corrimento amarelado. Usamos o cogumelo que colocamos na cavidade vaginal. Feito êste curativo às 16 horas a doente sentiu aumentarem as dores assim como aumentou consideràvelmente o corrimento. Sentiu dor de cabeça e calefrios. No outro dia pela manhã, às 11 horas, renovamos o curativo. Não se observou nenhuma reação. Mais dois curativos e estava pràticamente debelado o processo inflamatório anexial. A cervicite curou em mais 2 dias.

8 — M. F., 46 anos, casada, doméstica, branca, residente nesta capital. Veio à consulta em 28 de outubro de 1943. Anexite à E. Corrimento forte e amarelado. Emprêgo local do cogumelo. Sentiu-se indisposta e com dores abdominais. Depois do 3.º curativo melhorou ràpidamente e passaram as dores. Cessou o corrimento com o 4.º curativo.

9 — Helio M., 26 anos, solteiro, branco, aviador, residente nesta capital. Em 20 de janeiro de 1944 apresentava uma ulceração do sulco balanoprepucial, atingindo o meato. Èxame positivo para o Bacilo Ducrey. Usamos o cogumelo puro e a pasta diàriamente, durante 5 dias e não observamos melhoras apreciáveis. A ulceração continuava evoluindo, em face do que suspendemos êste tratamento, instituindo a piretoterapia pelo Termogênio com melhores resultados.

10 — Raimundo S., 28 anos, solteiro, branco, comércio, residente nesta cidade. Veio ao nosso consultório em 23 de outubro de 1943. Úlcera Ducrey do prepúcio. Tratamento com o cogumelo sem resultado satisfatório.

11 — Waldemar R. R., 45 anos, casado, branco, operário, aqui residente. Veio à consulta em 28 de fevereiro de 1944, apresentando uma conjuntivite por traumatismo do globo ocular E. Fizemos curativos com duas gôtas de penicilina, pela manhã e à tarde, durante dois dias, ao fim dos quais estava completamente curado.

12 — R. C., 24 anos, solteiro, estudante, branco, residente nesta cidade. A 2 de março dêste ano veio à consulta. Apresentava uma gonococia rebelde, sulfamido resistente. Há mais ou menos 4 meses vinha tendo forte corrimento uretral que não conseguia debelar, tendo já tomado 80 comprimidos de sulfatiazol sem resultado. Realizamos então o tratamento pela penicilina, por via intramuscular, injetando 5.000 unidades pela manhã e 5.000 à tarde, durante 8 dias. Depois da 1.ª injeção diminuiu a irritação da uretra, assim como o corrimento. Quando completamos 20.000 unidades já não existia mais corrimento, persistindo ainda alguns filamentos na urina. Fizemos mais 60.000 unidades a 10.000 por dia, por via intramuscular. Com êste tratamento não observamos reação alguma além de dor no local da injeção. Como já tivessem desaparecido todos os sintomas, julgando-se êste doente perfeitamente curado, pedimos exame cultural do esperma, sem, entretanto, termos até agora tomado conhecimento do resultado.

13 — João A. S., 22 anos, solteiro, estudante, residente nesta cidade. A 8 de março foi-nos consultar por ter notado um corrimento com alguma ardência da uretra, que começara há 3 dias. Como piorasse e a urina estivesse muito turva, urinando pouco e seguidamente, concordou em fazer injeções de penicilina. Fizemos inicialmente 8.000 unidades mais ou menos, em 20 cc., por via intramuscular. Queixou-se de muita dor no local da injeção, estando, contudo, muito animado com o resultado pois a irritação da uretra desaparecera. Fizemos mais 8.000 unidades por dia, 4.000 pela manhã e 4.000 à tarde, durante 5 dias. A cistite desapareceu, assim como o corrimento. Demos alta curado a êste doente depois de submetê-lo às provas de cura.

14 — P. C., 26 anos, solteiro, funcionário público, residente nesta cidade. Há mais ou menos 6 meses apresenta um corrimento uretral abundante, com exame positivo para o *Diplococcus de Neisser*. Por apresentar intolerância à sulfamida, não pôde se submeter a êsse tratamento. Recorremos então à penicilina e fizemos no primeiro dia 10.000 unidades por via intramuscular. Sentiu muita dor no local da injeção, mal-estar e dor de cabeça. O corrimento diminuiu um pouco. No outro dia repetimos mais 10.000 unidades e os mesmos sintomas se repetiram, tendo o paciente se queixado de que sofreu leve elevação da temperatura. Êstes sintomas se apresentavam logo 2 ou 3 horas depois de cada injeção, durando no máximo 2 horas. As melhoras eram mais ou menos evidentes ao fim do 2.º dia de tratamento, entretanto fomos forçados a interromper o tratamento por nos ter faltado substância ativa. Com isso houve a recidiva, agravando-se novamente o mal.

15 — A. S., 23 anos, solteiro, estudante, branco, residente nesta cidade. Apresentava uma gonorréia sulfamido resistente com corrimento abundante. Já havia tomado 160 comprimidos de sulfamida, sulfatiazol e salfapiridina, sem nenhum resultado. Tratado nas mesmas condições do caso precedente, pelo mesmo motivo fomos forçados a interromper o tratamento. As melhoras foram temporárias; suspenso o tratamento, agravou-se novamente a infecção. Neste caso não houve reação alguma e o paciente não se queixou de dores no local da injeção.

16 — Antonio L. O., 29 anos, branco, casado, operário, residente nesta cidade. Em 6 de dezembro de 1943 apresentou-se com um ferimento por esmagamento, infectado, do polegar E. Usamos o pó sôbre a ferida tendo se dado ràpidamente a regressão da in-

fecção. Usamos um curativo por dia, durante 3 dias, tendo curado ràpidamente.

17 — Basilio K., 43 anos, casado, branco, operário, aqui residente. Em 11 de novembro de 1943 apresentou um abcesso por calo infectado na palma da mão D. Incisamos e fizemos um curativo empregando o pó de *Penicillium*. Com 2 curativos não havia mais pus e a cicatrização foi feita em 7 dias.

ABSTRACT

The author has made special studies in the Pharmacological Laboratory of the University of Pôrto Alegre, Medical College, specially investigating the uses of cultures of *Penicillium notatum*. He suggésts the use of Coco water *(Coccus nucifera)*, or diluted coco nut milk as a base. He observes the formation of "floccose" when making a fresh culture with old spores. In considering methods of administration and doses, he analyzes carefully the effects of panicillin on rabbits'hearts; dividing the electrocardiograms taken of 16 rabbits into two groups of eight, one without anesthetic and the other using ether as an anesthetic. He concludes that the penicillin is not prejudicial in cases of anesthesia; even when used in heavy doses it caused no accident.

He makes a study of the use of *Penicillium notatum* in cases of open infections with satisfactory résults on infected wounds, anexites and inflamed cervix, in the same manner as PROFESSOR LOFORTE, Professor of the Cathedra of Pharmacology of the Medical College, has indicated.

He uses a powder of *Penicillium notatum* (prepared by dr. Heitor Fábregas) and also suggests a paste made with *Penicillium*. He refers to vatious cases treated in this way with good results. He makes references to two cases of gonorrhea resistant to sulfamide wich were quickly cured, where as in two others in which treatment was interrupted there was a relapse.

Shortly there will be published observations based on a large collection of facts made by the author.

BIBLIOGRAFIA

1 — Abraham, E. P. and Chain, E. — An enzyme from bacteria able to destroy penicilin. — Nature 146, 837. 1940.

2 — Abraham, E. P.; Chain, E.; Fletcher, C. M.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A. and Florey, H. W. — Further observations on Penicillin. — Lancet 241, 177. Aug. 1941.

3 — Abraham, E. P. — Purification of penicillin. — Nature 148, 758. Dec. 1941.

4 — Abraham, E. P. and Chain, E. — Purification of penicillin — Nature 149, 328. Mar. 1942.

5 — Abraham, E. P.; Baker, W.; Chain, E.; Florey, H. W.; Holiday, E. R. and Robinson, R. — Nitrogenous character of penicillin. — Nature, 149, 356. Marc. 1942.

6 — Abraham, E. P.; Chain, E. and Holiday, E. R. — Purification and some physical and chemical properties of penicillin. — Brit. J. Exptl. Path. 23, 103. June 1942.

7 — Abraham, E. P.; Chain, E.; Baker, W. and Robinson, R .— Penicillamine, a characteristic degradation product of penicillin. — Nature, 151, 107. Jan. 1943.

8 — Anslow, W. K. and Raistrick, H. — The biochemistry of microörganismus. — Bichem. J. 32, 687, 803, 2288 (1939). C. A. 32, 7955; Oct. 1938 e C. A. 33, 4287; June 1939.

9 — Aquiles Lentino do Felow Barnes Hospital — El Penicillin, un nuevo agente contra la infection bacteriana. — El Dia Médico, B. Ayres — 6 septiembre, 1943.

10 — Atkinson, Nancy — Antibacterial substances produced by molds. Penicidin, a product of the growth of a *penicillium*. — Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 20, 287. Dec. 1942.

11 — Barger, G. and Dorrer, O. — Chemical properties of puberulic acid and a yellow acid. — Biochemical J. 28, 1934.

12 — Birkinshaw, John H. and Raistrik, H. — Studies in the biochemistry of microörganismus. — Biochemical J. 26, 441. 1932.

13 — Birkinshaw, John H.; Chambers and Raistrick — Studies in the biochemistry of microörganismus. — Biochemical J. 36, 242. 1942.

14 — Blake, F. G. and Craige, B. Jr. — Penicillin in suppurative disease of the lungs. — Yale J. Biol. Med. 15, 507. 1943.

15 — Boden, Erich — Electrocardiografia para el médico prático. — Ed. Esp. — Trad. Francisco Piñero — 1937.

16 — Bordley, J. E.; Crowe, Dolowitz and Pickrell — The local use of the sulfonamides, gramicidin and penicillin in oto-

laryngology. — Ann. Otol. Rhin & Laryng. 51. 936. 1942.

17 — Budelmann, G. — Quais os conhecimentos de eletrocardiografia que deve ter o médico geral — Monografia — 1938 (Soc. Med. Hamburgo).

18 — Bush, M. and Goth — An antibacterial substance produced by an *Aspergillus flavus*. — Federation Proc. 2, 75. 1943.

19 — Catch, J. R.; Cook, A H. and Heilbron Purification and chemistry of penicillin. — nature 150, 633. 1942.

20 — Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heathley, N. G.; Jenings, M. A.; Orr-Ewing and Sanders, A. G. — Penicillin as chemotherapeutic agent. — Lancet 239, 226, 236. 1940.

21 — Chain, E. — Chemical and physical properties of penicillin in relation to bactericstatic action. — Nature 148, 758. 1941.

22 — Challinor, S. W. — Production of penicillin. — Nature 150, 688. 1942.

23 — Clutterbuck, P. W.; Lewell, R. and Raistrick, H. — The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali sclution protein and penicillin - the bactericidal substance of Fleming. — Biochemical J. 26, 1907. 1932.

24 — Cook, A. H. — Purification of Penicillin. — Biochem. J. 36, 23. 1942.

25 — Cook, Elton; Kreke, C. W.; Giersch. M. and Schroeder, M. P. — A grooth-depressant substance from yest. — Science, 93. 616. 1941.

26 — Coulthard, C. E.; Michaelis, R.; Short, W. F.; Sykes, G.; Skrimshire, G. E. H.; Standfast, A. F. B.; Birkinshaw, J. H.; and Raistrick, H. - Notation: an antibacterial glucose-serode-hidrogenase from *Penicillium noiatum* Westling. — Nature 150, 634. 1942.

27 — Craddock, Stuart — Use of penicillin in cultivation of the *acne Bacillus*. — Lancet 242, 558. 1942.

28 — De Somer, E. — Electrocardiographie experimentale. — Masson & Cia. Editeurs — 1938.

29 — Duffin, W. M. and Smith, S. — Penicillic acid, and optically active acid from penicillin. — Nature 151, 251. 1943.

30 — Dutcher, James D. — The chemical nature of gliotoxin: a microbicidal compound produced by the fungs *Gliocadium fimbriatum*. — J. Bact. 42, 815. 1941.

31 — Fleming, A. — The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* — Brit. J. Exptl. Path. 10, 226. 1929.

32 — Fleming, A. — The specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. — J. Path. Bact. 35, 832. 1932.

33 — Fleming, A. — Antisseptic in war-time surgery. — Pharm. J. 145, 162. 1940.

34 — Fleming, A. — A simple method of using penicillin, tellurit, and gentian violet for differential culture. — Brit. Med. J. I. 547. 1942.

35 — Fleming, A. — In vitro tests of penicillin potency. Lancet 242, 732. 1942.

36 — Florey, H. W. and Jennings, M. A. — Some biological properties of highly purifield penicillin. — Brit. J. Expt. Path. 23, 120. 1942.

37 — Florey, M. E. and Florey, H. W. — General and local administration of penicillin. — Lancet 244, 387. 1943.

38 — Foster, Jackson W. — Quantitative estimation of penicillin. — J. Biol. Chem. 144, 286. 1942.

39 — Foster, Jackson W. — Microbiological aspect of penicillin formation. — J. Bact. 45, 65. 1943.

40 — Gardner, A. D. and Chain, E. — Proactinomicin: a "bacteriostatic" produced by a species of *Proactinomices*. — Brit. J. Exptl. Path. 23, 123. 1942.

41 — Glister, G. A. — A new antibacterial agent produced by a mold. — Nature 148, 470. 1941.

42 — Hassib Ashcar — Contribuição ao estudo morfo-biológico do *Penicillium notatum*. — Revista do Inst. A. Lutz. S. Paulo, Brasil, II, n.º 2, 309. 1942.

43 — Heilmann, Dorothy H. and Herrell, Wallace E. — Comparative bacteriostatic activity of penicillin and gramicidin. — J. Bact. 43, 12. 1942.

44 — Heilmann, Dorothy H. and Herrell W. E. — Comparative antibacterial activity of penicillin and gramicidin: Tissue culture studies. — Proc Staff Meetings Mayo Clinic 17, 321. 1942.

45 — Herrel, W. E.; Heilmann, Dorothy; and Williams, H. L. — The clinical use of penicillin. — Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 17, 609. 1942.

46 — Herrel, W. E. — Further observations on the clinical use of penicillin. — Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 18, 65. 1943.

47 — Herrell, W. E.; Cook, E. N. and Thompson, L. Use of penicillin in sulfonamide-resistent gonorrheal infections. — J. A. M. A. 122, 289. 1943.

48 — Herrell, W. E. — Gramicidin and penicilin. — Trained Nurse and Hospital Rev. 110, 114. 1943.

49 — Herrell, W. E. and Heilmann, Dorothy — Tissue cultures studies on citotoxicity of bactericidal agent. Effects of gramicidin, tirocidine and penicillin on cul-

tures of mammalian lymph node. — Am. J. Med. Sci. 205, 157. 1943.

50 — Hobby, Gladys; Meyer, Karl and Crafee, Eleanor — Activity of penicillin in-vitro. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 50 277, 1942.

51 — Hobby, Gladys; Meyer, Karl and Chafee, Eleanor — Observations on the mechanism of action penicillin. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 50, 281. 1942.

52 — Hobby, Gladys; Meyer, Karl and Chafee, Eleanor. — Chemotherapeutic activity of penicillin. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 50, 285. 1942.

53 — Hobby, Gladys; Meyer, Karl; Chafee, Eleanor and Dawson, Martin — The nature and action of penicillin. — J. Bact. 45, 65. 1943.

54 — Kocholaty, Walter — 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. 1942.

55 — Kocholaty, Walter — Purification and properties of penatin, the second antibacterial substance produced by *Penicillium notatum* Westling. — Arch. Biochem. 2, 73. 1943.

56 — Loforte, Manuel Gonçalves — Síncopes anestésicas — Tese cátedra-Faculdade de Medicina Pôrto Alegre — 1939.

57 — McKee, Clara M. and Rake, Geoffrey — Biological experiments with penicillin. — J. Bact. 43, 645. 1942.

58 — McKee, Clara and Rake, Geoffrey — Activity of penicillin against strains of pneumococci resistant to sulfonamid drugs. — Proc. Soc. Evptl. Med. 51, 275. 1942.

59 — McKee, C. M. and Houck, C. L. — Induced penicillin resistance in a *Pneumococcus* type III culture. — Federation Proc. 2, 100. 1943.

60 — Meyer, Earl; Chafee, Eleanor; Hobby, G. L.; Dawson, M. H.; Schwenk, E.; and Fleischer, G. — On Penicillin. — Science 96, 21. 1942.

61 — Meyer, Karl; Hobby, G. and Chafee, Eleanor — On esters of penicillin. — Science, 97, 205. 1943.

62 — Oxford, Albert; Raistrick, H. and Smith, George — Antibacterial substances from moulds. Penicilic acid, a metabolic product of *Penicillium puberulum* Rainier and *Penicillium cyclopium* Westling. — Chemistry and Industry 61, 22. 1942.

63 — Oxford, A. E. — Antibacterial substances from moulds. Some observations on the bactericstatic powers of the mould products citrinin and penicilic acid. — Chemistry and Industry 61, 48. 1942.

64 — Oxford, A. E. and Raistrick, Harold — Antibacterial substances from moulds IV. Spinulosin and fumigatin, metabolic products of *Penicillium spinulosun* Thom and *Aspergillus fumigatus* Fresenius. — Chemistry & Industry 61, 128. 1942.

65 — Oxford, A. E. — On the chemical reations ocurring between certain substances which inhibit bacterial growth and the constituents of bacteriological media. — Biochem. J. 36, 438. 1942.

66 — Oxford, A. E.; Raistrick, H. and Smith, G. — Antibacterial substance from moulds. VI. Puberulic acid und Puberulonic acid, metabolic products of a number of species of *Penicillium*. — Chemistry & Industry 61, 485. 1942.

67 — Pazzanese, Dante, O eletrocardiograma — Publicações Médicas — Agôst.-Set. 1935.

68 — Powell, H. M. and Jamieson, W. A. — Response of sulfamidefast pneumococci to penicillin. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49, 387. 1942.

69 — Powell, H. M. and Jamieson, W. A. — Penicillin chemotherapy of mice infected with *Staphylococcus aureus*. — J. Indiana M. A. 35, 361. 1942.

70 — Raistrick, H. and Smith, G. — Biochemistry of microörganismus. The metabolic products of *Aspergillus*. terreus Thom. — Biochem. J. 29, 606. 1935.

71 — Rammelkamp, Charles H. — A method for determining the concentration of penicillin, in body fluids and exudates. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 51, 95. 1942.

72 — Rammelkamp, Charles H. and Maxon, Thelma — Resistence of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 51, 386. 1942.

73 — Rammelkamp, Charles H. and Keefer, Chester S. — The absorption, excretion and toxicity of penicillin administered by intrathecal injection. — Am. J. Med. Sci. 205, 342. 1943.

74 — Rammelkamp, Charles H. and Keefer, Chester S. — The absorption, excretion and distribuition of penicillin. — J. Clin. Investigation 22, 425. 1943.

75 — Rammelkamp, Charles H. — Mode of action of gramicidin and penicillin in the treatment of infections. — J Bact. 45, 66. 1943.

76 — Ramos, Jairo — Lições de electrocardiologia clínica — São Paulo. 1935.

77 — Reid, Roger D. — The ability of a mold or its metabolic products to inhibit bacterial growth. — J. Bact. 27, 28. 1934.

78 — Reid, Roger D. — Some properties of bacterial inhibitory substance produced by a mold. — J. Bact. 29, 215. 1935.

80 — Roberts, E. C.; Cain, C. K.; Muir, R. D.; Reithel, F. J.; Gaby, W. L.; Van Bruggen, J. T.; Homan, D. M.; Katzman, P. A.; Jones, L. R. and Doisy, E. A. — Penicilin β, an antibacterial substance from *Penicillium notatum*. — J. Biol. Chem. 147, 47. 1943.

81 — Robinson, H. J. and Waksman, Selman A. — Studies on the toxicity of actinomicin. — J. Pharmacol. 74, 25. 1942.

82 — Robinson, H. J. — Toxicity and efficacy of penicillin. — J. Pharmacol. 77, 70. 1943.

83 — Robson, J. M. and Scott, G. I. — Effect of certain chemoterapeutic agents on experimental eye lesions produced by *Staphylococcus aureus*. — Nature 149, 581. 1942.

84 — Rocha, Ruy Vieira da — Contribuição ao Estudo da Penicilina. Tese de doutoramento. 1943.

85 — Tillett, W. S.; Cambier, M. J. and Harris, W. J. — Sulfonamide-fast pneumococci; a clinical report of two cases of pneumonia together with experimental studies on the effectiveness of penicillin and tyrothricin against sulfonamide-resistant strains. — J. Clin. Investigation 22, 249. 1943.

86 — Timonin, M. I. — Another mould with anti-bacterial ability. — Science 96, 494. 1942.

87 — Waksmann, Selman A. and Woodruff, H. Boyd — Bacteriostatic and Bactericidal substances produced by a soil *Actinomyces*. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 45, 609. 1940.

88 — Waksmann, Selman A. and Tishler, Max — The chemical nature of actinomycin, and anti-microbial substance produced by *Actinomyces antibioticus*. — J. Biol. Chem. 142, 519. 1942.

89 — Waksmann, Selman A.; Horning, Elisabeth and Spencer — The production of two antibacterial substances, fumigacin and clavacin. — Science 96, 202. 1942.

90 — Waksmann, Selman A.; Horning, Elisabeth and Spencer — Two antagonist fungi, *Aspergillus fumigatus and Aspergillus clavatus*, and their antibiotic substances. — J. Bact. 45, 233. 1943.

91 — Waksmann, Selman A. and Woodruff, H. Boyd — Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. — J. Bact. 44, 373. 1942.

92 — Waksmann, Selman A. — Nature and mode of action of antibiotic substances. — J. Bact. 45, 64. 1943.

93 — Welsch, Maurice — Bactericidal substances from sterile culture-media and bacterial cultures. With special reference to the bacteriolytic properties of *Actinomycetes*. — J. Bact. 42, 801. 1941.

94 — Welsch, Maurice — Bacteriostatic and bacteriolytic properties of *Actinomycetes*. — J. Bact. 44, 571. 1942.

95 — White, Edwin C. — Bactericidal filtrates from a mold culture. Science 92, 127. 1940.

96 — Wiesner, B. P. — Bactericidal effects of *Aspergillus clavatus*. Nature, 149. 356. 1942.

97 — Winkins, W. H. and Harris, C. M. C. — Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of 100 fungal species. — Brit. J. Exptl. Path. 23, 166. 1942.