

Produção de penicilina terapêutica

por

Humberto T. Cardoso, Mireille I. Carneiro Felipe, Clotilde Pirro e
Eline M. Bona

Desde sua descoberta os químicos sempre tiveram tarefa importante na produção da penicilina, a-pesar-de ser a mesma produto biológico, produzido por um cogumelo, o *Penicillium notatum*. A razão disso reside no fato de que a sua preparação, embora dependa da capacidade produtora do cogumelo, exige, para a obtenção de produtos altamente concentrados, a aplicação de uma série de recursos físicos, químicos e físico-químicos, executados mediante cuidados especiais, dada a grande instabilidade da penicilina.

Estando o Diretor do Instituto Oswaldo Cruz interessado em que se procedessem estudos sobre esta nova substância bacteriostática, cujas propriedades e valor terapêutico eram ainda pouco conhecidos, foram conjugados os trabalhos das Seções de Micologia e de Química neste sentido.

Desta maneira, em meados de 1942, encarregamo-nos do problema relativo à extração e tratamentos subsequentes da penicilina, tendo recebido assistência especial do Dr. HENRIQUE DE ARAGÃO, nosso Diretor, a qual, aliada à esplendida cooperação da Seção de Micologia, sob a Chefia do Dr. A. E. de ARÊA LEÃO, muito facilitou a nossa tarefa.

Embora sem qualquer finalidade industrial, não pudemos evitar as operações com volumes relativamente grandes, afim de obter material suficiente para o conhecimento das propriedades da penicilina, e elaborar uma técnica de emergência para sua produção, sob fórmula injetável, para fins terapêuticos, uma vez que não contávamos com bibliografia estrangeira sobre o assunto. Dessa fórmula, foi possível preparar certa quantidade desse produto e organizar, com os dados colhidos, uma pequena fábrica-piloto que, de produção reduzida, vem fornecendo o material em quantidade suficiente para várias investigações científicas.

Os técnicos de outras Seções especializadas de nosso Instituto vêm realizando observações nos mais variados campos e, particularmente, foram fixa-

(*) Recebido para publicação a 21 de Junho de 1945.

dos dois temas cujos resultados estão sendo publicados: o tratamento da Bouba (*Framboesia pian*, Yaws) pela penicilina, observação original da Divisão de Estudos de Endemias (4 e 5) que conquistou os louros da prioridade nêsse assunto para o nosso Instituto e a investigação das doses mínimas, terapêuticamente ativas, cuja importância não é necessária acentuar.

A administração da penicilina, por via oral, foi tentada, também, de início e abandonada, desde que estávamos obtendo bom material injetável e recebendo pedidos superiores à nossa produção.

Não fôra a possibilidade de se contar com penicilina terapêutica, de nossa fabricação e, certamente, não teríamos obtido tão rápidos e originais resultados, além da vantagem de se ter podido socorrer mais de um milhar de pessoas, vítimas de graves enfermidades.

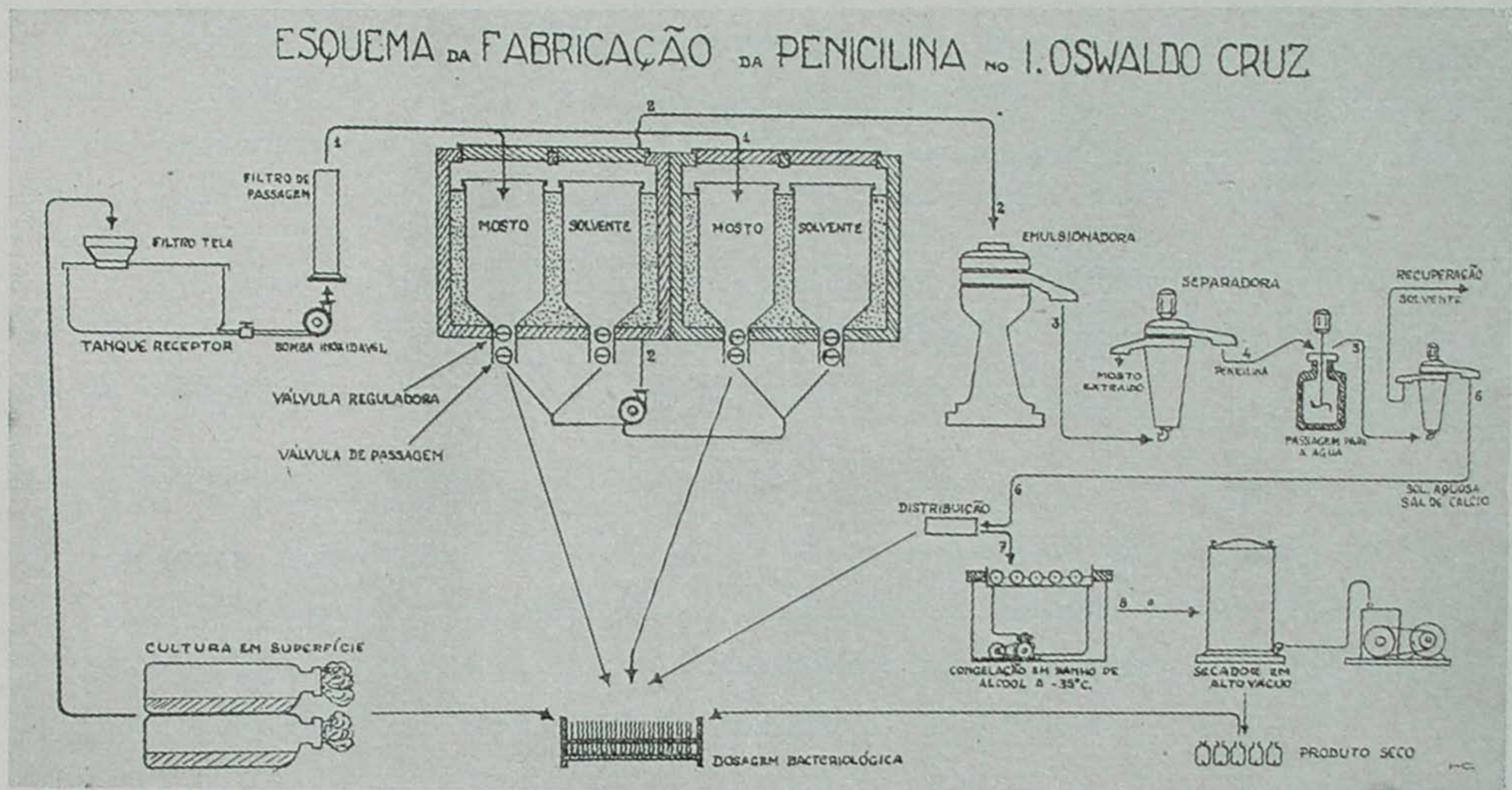
Hoje, vemos que a orientação dos nossos pesquisadores estava certa, bastando citar as mais recentes publicações estrangeiras em que se faz menção de sucessos obtidos com doses baixas e, também, da administração oral de penicilina.

Assim, foi diante da seqüência dos resultados clínicos que progredimos no preparo e purificação da penicilina, já que nenhuma informação nos chegava através da literatura científica, particularmente no tocante ao aspecto químico do problema.

O ponto de partida do nosso trabalho foi a técnica descrita por FLOREY et al. (1), onde foram relacionadas as principais propriedades da nova substância bacteriostática.

Do ponto em que se acha atualmente o problema, achamos que a produção em larga escala, da penicilina, se resume numa questão de engenharia química, já que as exigências iniciais de uma alta purificação desapareceram, seja pelo abandono da via endovenosa para a sua aplicação, seja pelo uso de meios de cultura que permitem a obtenção de elevado teor em penicilina. O produto final, obtido a partir dêstes meios e por uma manipulação simples, conduz a uma mistura de penicilina e pigmentos, que pode ser usada terapêuticamente, sem fenômenos de toxicidade, à exceção, apenas, do emprego da via endovenosa.

A maior pureza do produto final fica condicionada à maior riqueza inicial do mosto. Isto já havia sido referido em palestra que fizemos anteriormente em Manguinhos e, hoje, sabemos terem as fábricas americanas adotado, há muito, o critério de incrementar a produção inicial no mosto, para abandonar qualquer operação de alta purificação.



Cardoso, Carneiro Felipe, Pirro e Bona. Produção da penicilina terapêutica. Esquema da fábrica-piloto usada no Instituto Oswaldo Cruz.

Comparando o material de fabricação americana com o de nossa produção, tivemos oportunidade de constatar a identidade das impurezas presentes nas mesmas, pelo exame espectrofotométrico e, quanto à sua atividade terapêutica, o trabalho clínico realizado no Hospital Evandro Chagas, nos casos de Bouba, por Marques da Cunha et al., (5) demonstrou claramente a equivalência dos produtos.

Vamos descrever neste trabalho, pois, a técnica e a aparelhagem que empregamos na fábrica-piloto, cuja capacidade é de, aproximadamente, sessenta milhões de unidades Oxford mensais.

Penicilina bruta — É imprópriamente assim chamado o caldo de cultura onde se desenvolve o penicílio, durante certo tempo. As minúcias relativas à técnica micológica e à composição dos caldos empregados serão expostas pelo Dr. Arêa Leão e colaboradores.

É de capital importância, para a qualidade do produto final, a atividade do caldo. Quanto mais elevado o poder impediente, encontrado inicialmente, tanto mais ativo será o produto obtido em estado sólido.

Filtração do mosto :

Usa-se, nesta fase, um tanque de aço inoxidável ou, mesmo, de ferro fortemente estanhado, de 60 litros de capacidade, dotado de uma tampa onde existe adaptação para um funil com tela de arame inoxidável, de 625 malhas por cm²., destinado à separação do grosso do micélio.

No fundo desse tanque há uma saída com torneira, que se liga diretamente ao centro de uma bomba centrífuga, de palheta de aço inoxidável, desmontável para limpeza. Esta bomba, de fabricação nacional, tem saída de 1,5" e recalca o líquido, fazendo-o passar através de um filtro de passagem, do tipo C. P., de capacidade para 600 litros/hora, de ferro fortemente estanhado, onde se encontra uma camada de papel de fitro protegido por um pano de flanela.

O líquido, passando pelo filtro, fica livre de impurezas, inclusive dos restos do micélio, e segue por uma canalização, ainda recalcado pela mesma bomba, para os reservatórios resfriados, para as operações seguintes.

Extração :

Esta parte da manipulação se inicia com o resfriamento do mosto filtrado, nos reservatórios de aço inoxidável, mergulhados em câmaras de salmoura a -20.°C. Os reservatórios são de 60 litros de capacidade cada um e em número de quatro. Distribuem-se, dois a dois, nas câmaras de salmoura. Para

resfriar a salmoura, emprega-se uma unidade refrigeradora, de capacidade para 800/900 cal./hora.

Para homogenizar o refrigerante nas câmaras, há uma bomba de circulação, de capacidade para impulsionar até 1.000 litros /hora à altura manométrica de 4 metros.

O resfriamento do mosto, nessas condições, é muito rápido, devendo-se evitar a sua congelação nas paredes do recipiente.

Simultaneamente, enquanto dois reservatórios estão com o mosto, 50 litros em cada, os restantes estão carregados, com a mesma quantidade do solvente que vai ser usado para a extração.

A colocação prévia do solvente nesses tanques é aconselhada, pois, não havendo o perigo de se congelar, facilitará a manutenção de temperatura baixa durante as operações seguintes.

Desde que o mosto atinge temperatura próxima de 0°C., adiciona-se o ácido, que pôde ser qualquer um dos minerais, em solução a 10% e em quantidade suficiente para fazer o pH baixar a 1.9-2.0.

Isto é feito rapidamente e, controlada a acidez por potenciômetro, inicia-se a extração propriamente dita, pela sucção de porções equivalentes do mosto e do solvente, por meio de uma bomba centrífuga de aço inoxidável, idêntica à descrita na operação da filtração.

Os tanques têm as saídas na parte inferior das câmaras, tendo os seus fundos a forma de funil, ligados todos à mesma bomba. Cada tanque é dotado de duas torneiras esmerilhadas, uma para regulagem do fluxo e outra para passagem dos líquidos.

Regulam-se os fluxos do mosto e do solvente, de modo a obter uma mistura de partes iguais, de ambos.

A bomba recalca, então, essa mistura para uma emulsionadora, de fabricação DE LAVAL, do tipo usado para homogenização do leite, nas usinas de beneficiamento desse alimento. Tem esta máquina um rotor inoxidável, de tríplex efeito, com velocidade de cerca 9.000 revoluções por minuto e com capacidade para retenção de cerca 350 g. de sólidos.

A emulsão formada nesta máquina permite a retirada da penicilina, na sua forma ácida, pelo solvente.

A emulsionadora descarrega diretamente sobre o coletor de uma separadora centrífuga, de rotor de aço inoxidável. O tipo desta máquina é o comumente empregado para leite, com capacidade de 340 litros horários.

Para aumentar a rapidez desta operação, poderão ser usadas duas separadoras em paralelo.

O líquido, ao sair da separadora, deve ter temperatura inferior a + 7°C.

Tem-se, assim, a penicilina isolada do caldo de cultura e somente acompanhada de algumas impurezas, tais como pigmentos, de propriedades químicas muito próximas às da penicilina. Esta é a técnica que empregamos, sendo não só bastante eficaz como, também, econômica.

Outros métodos de extração, por nós experimentados (6 e 8), não se revelaram melhores nem de mais fácil industrialização.

Recuperação da penicilina do solvente — A técnica original de FLOREY, modificada por ABRAHAM e CHAIN (2), aconselha a extração do solvente orgânico com água, ajustado o seu pH para 6,5 a 7,0 com barita N/30. O sal de bário assim formado, desloca-se do acetato de amila para a água. Nessa passagem, há uma redução sensível de volume e, conseqüentemente, uma primeira concentração da penicilina, cerca de 50 vêses.

Iniciamos nossas observações empregando a barita, de acôrdo com essa técnica. Há grande vantagem no preparo desse sal, quando se vai secar o produto final, desde que é muito estável, mesmo na temperatura ambiente.

Entretanto, para o uso parenteral, o sal de bário tem inconvenientes que impõem a sua supressão. Assim, ao se prepararem ampôlas para uso imediato, transformava-se esse sal no de sódio, pela adição cuidadosa de sulfato de sódio.

Pode-se, também, usar solução de bicarbonato de sódio, na operação da retirada da penicilina do solvente, formando diretamente o sal desse metal.

O fato de ser esse sal mais higroscópico, dificultando a secagem e exigindo maiores cuidados no acondicionamento final, é o inconveniente notado neste procedimento.

A solução que nos pareceu mais viável é a da preparação do sal de cálcio que, sendo bem estável, não apresenta os inconvenientes do bário nem do sódio.

Milhares de injeções feitas com ampôlas do sal de cálcio, de nossa fabricação, sem qualquer contratempo, permitem-nos sugerir o seu emprêgo.

A concentração verificada na passagem da penicilina para a solução aquosa, da mesma ordem da referida a respeito do bário, pela técnica de ABRAHAM & CHAIN (2), é consequência do modo de operar, que é o seguinte: em frascos com dupla parede isolante ou, simplesmente, mergulhados em mistura refrigerante, porções sucessivas de dois litros de solvente (que deve estar resfriado a cerca de 4°C.) contendo a penicilina, são tratados com 600cm³, de

água contendo carbonato de cálcio e agitados fortemente por meio de agitadores elétricos de alta potência.

Em seguida, nas mesmas separadoras centrífugas, antes referidas, desdobra-se a mistura em solvente, praticamente isento de penicilina, e uma solução aquosa do sal de cálcio da penicilina. Esta parte aquosa volta a extrair nova porção do solvente com penicilina.

Dêsse modo, uma mesma porção da água extrai a penicilina de várias quantidades de solvente, acarretando uma concentração parcial.

Nessa fase, é imprescindível acompanhar cada operação, determinando e corrigindo incessantemente o pH, por meio de potenciômetro, para maior precisão na medida. Qualquer oscilação pode determinar grande perda do material ativo. A estabilidade da penicilina, depois de formado o sal, aumenta muito, mas é de bom aviso não deixar a temperatura exceder de + 10°C.

O extrato deve ser filtrado imediatamente em filtro esterilizante, para garantia de sua preservação, até futuras manipulações. As operações anteriores não são asséticas, de forma que pode haver contaminação por gérmenes capazes de produzir substâncias anti-penicilina ou destruidoras desta, prejudicando a continuação do trabalho.

O material proveniente de 100 litros de meio de cultura pode ser usado, na fase seguinte, imediatamente ou aguardar extratos de outros lotes.

Concentração :

Com o fim de fazer uma certa purificação do material extraído e, ao mesmo tempo, diminuir o volume do líquido a secar, introduzimos uma segunda extração dêsse primeiro material, seguindo a mesma técnica descrita antes, usando apenas frascos menores e separadoras centrífugas pequenas, de 120 litros horários.

As quantidades são equivalentemente reduzidas, em relação às usadas no processo inicial. Também é preparado o sal de cálcio, nesta operação.

Os extratos finais, concentrados, de sal de cálcio da penicilina são, a seguir, filtrados em placa esterilizante e distribuídos nos frascos, onde serão dessecados.

Dessecação :

O material que vai ser dessecado é distribuído nos frascos, esterilizados previamente, em quantidade calculada pelo título da dosagem bacteriológica feita sobre o extrato, de modo que cada recipiente contenha um número exato de unidades.

Os frascos, que são dotados de rolhas de borracha, são imersos em um banho de álcool resfriado a $-30.^{\circ}$ a $-35.^{\circ}\text{C}.$, afim de fazer congelar o material. Isto se dá rapidamente.

O resfriamento do álcool pode ser conseguido com a adição de gelo seco (neve carbônica) ou, simplesmente, por meio de uma serpentina de expansão, de uma unidade refrigerante a gás Freon.

Congelado o material, é o mesmo depositado em reservatório refrigerado, mantido em temperatura inferior a $-20^{\circ}\text{C}.$, durante algum tempo, para homogenizar a temperatura.

Êstes frascos são levados, depois, rapidamente, em taboleiros metálicos, à câmara de secagem, onde se faz imediatamente um vácuo de 0.5 mm. Hg., pressão que deve ser atingida em menos de $\frac{1}{4}$ de hora.

As câmaras de secagem que usamos são grandes dessecadores de ferro, cilíndricos, de 50 cm. de diâmetro por 1.20 m. de alto, dotados de tampa com gacheta de borracha, fácil de ser apertada por meio de parafusos. O vedamento dessas câmaras deve ser o mais perfeito possível.

Êsses dessecadores acham-se carregados com uma substância higroscópica até $\frac{2}{3}$ de sua capacidade. Cada cilindro pode secar até cerca de meio litro de material.

Colocado o material dentro da câmara, esta é imediatamente fechada e a bomba de vácuo posta a funcionar, de maneira a obter uma pressão de 500 micra ou menos, em quinze minutos. A bomba é do tipo Cenco Megavac.

Em cêrca de vinte horas, o sal de cálcio da penicilina está sêco, poroso, com menos de 1% de umidade. Rehidrata-se facilmente, em menos de um minuto, quando se lhe adiciona água destilada.

Faz-se, a seguir, uma dosagem de verificação do lote, além da prova bacteriológica.

Penicilina terapêutica:

Desde que, para atender às necessidades das investigações, são necessárias muitas ampôlas diariamente, decidimos usar os extratos dessecados, sem condições de assepsia, uma vez que, redissolvido o material, o mesmo é filtrado em vela esterilizante e distribuído assepticamente.

Do exposto anteriormente, vê-se que a penicilina terapêutica que produzimos não sofre manipulações especiais, destinadas a uma alta purificação.

Entretanto, embora seja ativa, terapeuticamente, uma penicilina de 50 a 80 unidades Oxford por miligrama, é desejável a obtenção de material mais puro.

Isto é conseguido, facilmente, graças ao uso de meios de cultura que dêem melhor rendimento da substância bacteriostática. O produto final, obtido nestas condições, como já frizamos antes, tem maior número de unidades por unidade de peso.

A simples elevação do título inicial para 1/500 já permite obter penicilina dosando 150.000 unidades Oxford por grama.

Diante dos resultados que vimos colhendo, parece evidente que a quantidade dos pigmentos que acompanham a penicilina não são formados em quantidade diretamente proporcional a esta última, mas que, produzindo-se maior porção de substância bacteriostática, ativa "in vitro", relativamente decresce a de certos pigmentos considerados como impurezas, adsorvidos na mesma zona cromatográfica da penicilina.

As impurezas têm inconvenientes, segundo os autores, no produto para uso endovenoso. Entretanto, essa via não é aconselhada, sendo preferível a intramuscular (7), por conduzir a bons resultados, sem os perigos daquela.

Aliás, é interessante notar a rapidêz do progresso da industrialização da penicilina nos Estados Unidos, que pode ser inferida do fato de que, ainda em 1943, o padrão inglês da penicilina continha 42.000 unidades e o americano 100.000 unidades Oxford por grama (3).

Em 1944, o padrão do "Food and Drug Administration" já acusava 320.000 unidades Oxford por grama.

Em laboratório, entretanto, já havia sido possível, nessa data, obter penicilina com mais de 1.000.000 de unidades.

Exame espectrofotométrico e espectrográfico da penicilina terapêutica, produzida no Instituto Oswaldo Cruz e em algumas fábricas americanas — Com a finalidade de compararmos os pigmentos, que impurificam a penicilina obtida pela técnica aqui descrita, com os que acompanham a de fabricação americana, realizamos uma série de exames espectro fotométricos e espectrográficos de amostras variadas.

Embora nosso maior interesse estivesse no aspecto qualitativo do exame, empregamos soluções com concentrações idênticas em unidades Oxford. Dêsse modo, pode-se ter, também, uma idéia da quantidade de pigmento presente.

O exame dos espectrogramas e curvas típicas de absorção (gráfico I) mostra a semelhança entre as amostras examinadas. Êsses resultados, aliás, são confirmados pelos cromatogramas das mesmas amostras. Nêstes, os desdobramentos verificados são semelhantes, variando, apenas, as intensidades de cada camada.

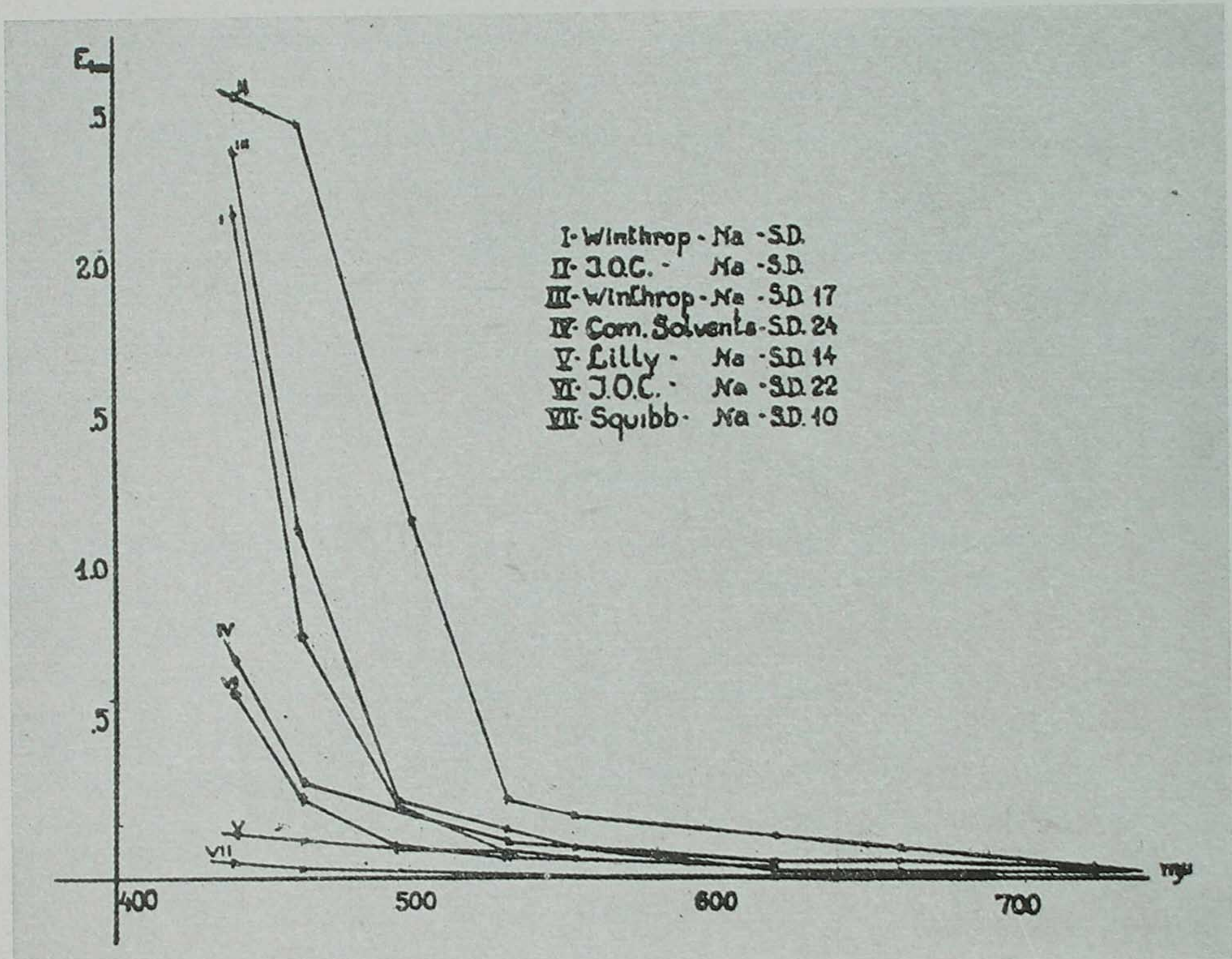


GRÁFICO I.

Cardoso, Carneiro Felipe, Pirro e Bona. Produção da penicilina terapêutica. Curvas de absorção da luz, obtidas com soluções de sal de sódio da penicilina, de várias procedências.

As purificações sucessivas eliminam simplesmente a quantidade dos pigmentos sem alterar sensivelmente a forma da curva típica.

Conclusão — A produção da penicilina terapêutica, para uso pela via parenteral, pode ser muito simplificada, pela introdução de uma técnica de concentração e purificação, reduzindo o volume e permitindo a secagem imediata.

Não há indícios de que o produto, assim preparado, tenha qualquer toxicidade.

A preparação do sal de cálcio para "stock" é aconselhada, por sua maior estabilidade e facilidade de manipulação.

E' descrita a maquinária de uma instalação-piloto, que pode fornecer até 60.000.000 de unidades Oxford, mensalmente.

Trata-se de montagem simples e econômica, que poderá ser usada por pequenos laboratórios.

SUMMARY

It is described in this paper the pilot-plant, for the production of Penicillin, with a capacity of, approximately, sixty million Oxford units per month, used at the Oswaldo Cruz Institute.

With this plant it has been possible to produce the active material for several clinical observations and the treatment of more than thousand patients during the war time. Particularly, this refers to the results obtained in the treatment of the disease *Framboesia pian*, Yaws (4,5) and in others diseases, by the use of very small dosis of Penicillin.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E., FLETCHER, C. M., GARDNER, A. D., HEATELY, N-G., JENNING, M. A. AND FLOREY, H. W.
1941. Further observations on penicillin. The Lancet, vol. 2 pgs. 177-188.
2. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E., HOLIDAY, E. R.
1942. Purification and some physical and chemical properties of penicillin. Brit. J. Expl. Path., vol. 23, pgs. 103.
3. BETHEA, O. W.,
1944. General Therapeutics, pgs. 97. Year Book Publishers, Chicago, Estados Unidos da América.
4. CUNHA, A. M. DA, ARÊA LEÃO, A. E., GUIMARÃES, F. NERY, E CARDOSO, H. T.,
1944. Ensaio terapêuticos com a penicilina. I — Bouba (*Framboesia pian*, Yaws). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, tomo 40, fasc. 2, pgs. 195-200.

5. CUNHA, A. M. DA, ARÊA LEÃO, A. E., GUIMARÃES, F. NERY, e CARDOSO, H. T.,
1944. Ensaio terapêuticos com a penicilina. III — Bouba (*Framboesia, pian, Yaws*).
Mem. Inst. Oswaldo Cruz, tomo 41, fasc. 2, pgs. 247-255.
6. MEYER K., CHAFFEE, E. HOBBY, G. L., DAWSON, M. H. SCHWENCK, E., e
FLEISHER, G.,
1942. Special article on penicillin. Science, vol. 96, pgs. 20 a 21.
7. RAMMELKAMP, C. H., e KEEFER, C. S.,
1943. The absorption, excretion and distribution of penicillin, J. Clin. Invest., vol. 22,
pgs. 425 a 437.
8. TSUN T'UNG,
1943. Concentration and preservation of crude penicillin. Proc. Soc. Exptl. Biol.
and Med., vol. 54, pgs. 103 a 105.