

# Método de preparação e atividade antiproteolítica dos sulfonatos cariofilênicos

por

N. Botafogo Gonçalves

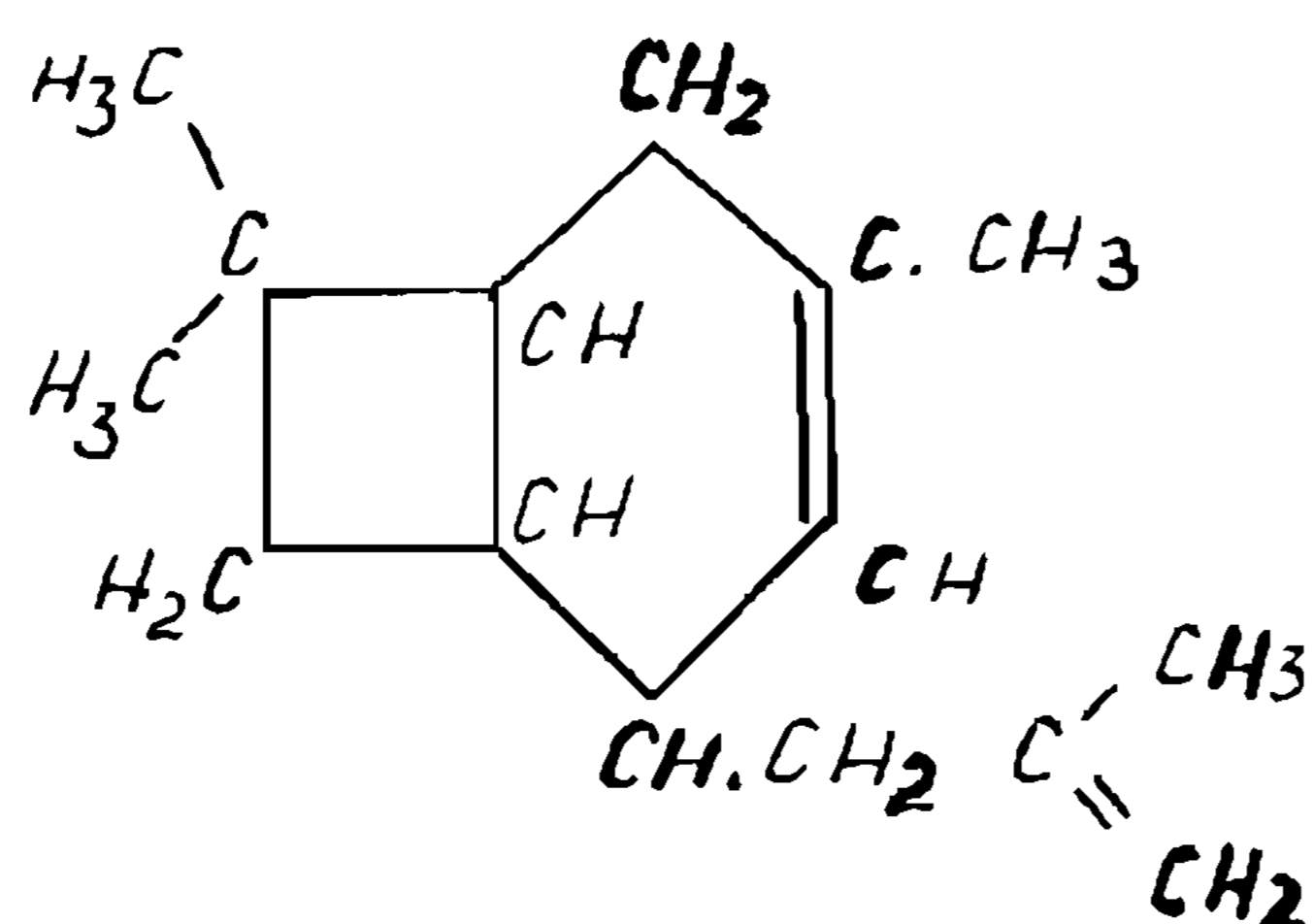
(Com 1 fotografia e 4 gráficos)

O óleo essencial obtido pela passagem do vapor d'água ou pela destilação a pressão reduzida, do bálsamo de copaíba é constituído pela mistura de sesquiterpenos que receberam a denominação de cariofilenos. Ultimamente muito se tem investigado sobre a constituição dos cariofilenos obtidos do óleo de cravo (cloves oil), de constituição idêntica, provavelmente, aos cariofilenos encontrados no óleo de copaíba e ao humuleno do óleo de lupulo.

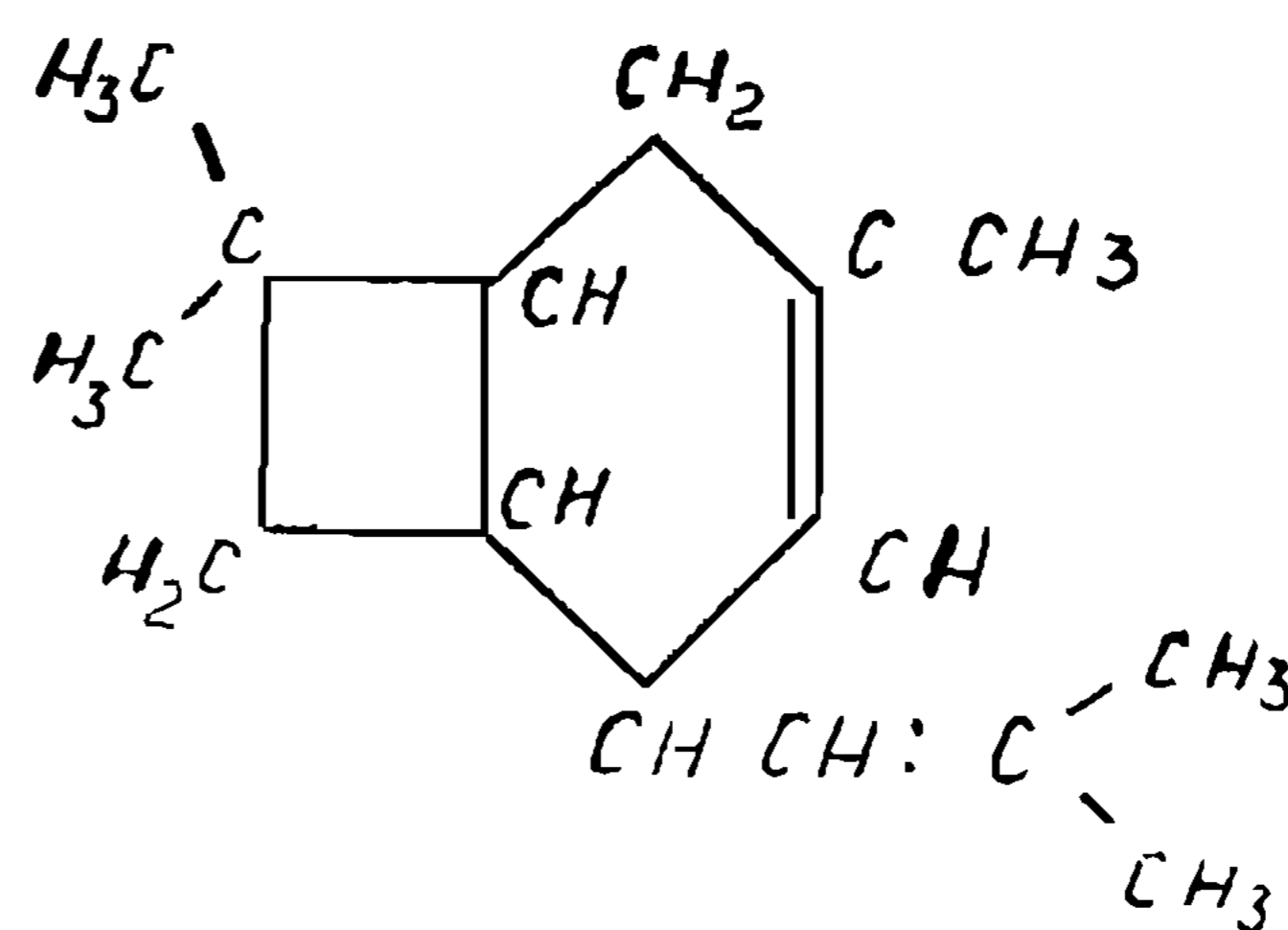
Esses sesquiterpenos são formados pelos isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A percentagem de cada um desses hidrocarbonetos varia nas diversas amostras de óleo, variação essa que, no que diz respeito ao óleo de copaíba, está em relação com a proveniência do óleo. As constantes físicas de vinte amostras desse óleo, que tivemos oportunidade de investigar, variavam nos seguintes limites:

Densidade 25/25°	0,9084 a 0,9106
Poder rotatório 25°	— 4°,2 a — 26°,4
Índice de refração 20°	1,4955 a 1,4920
Destilação (8 mm.)	110° a 130°

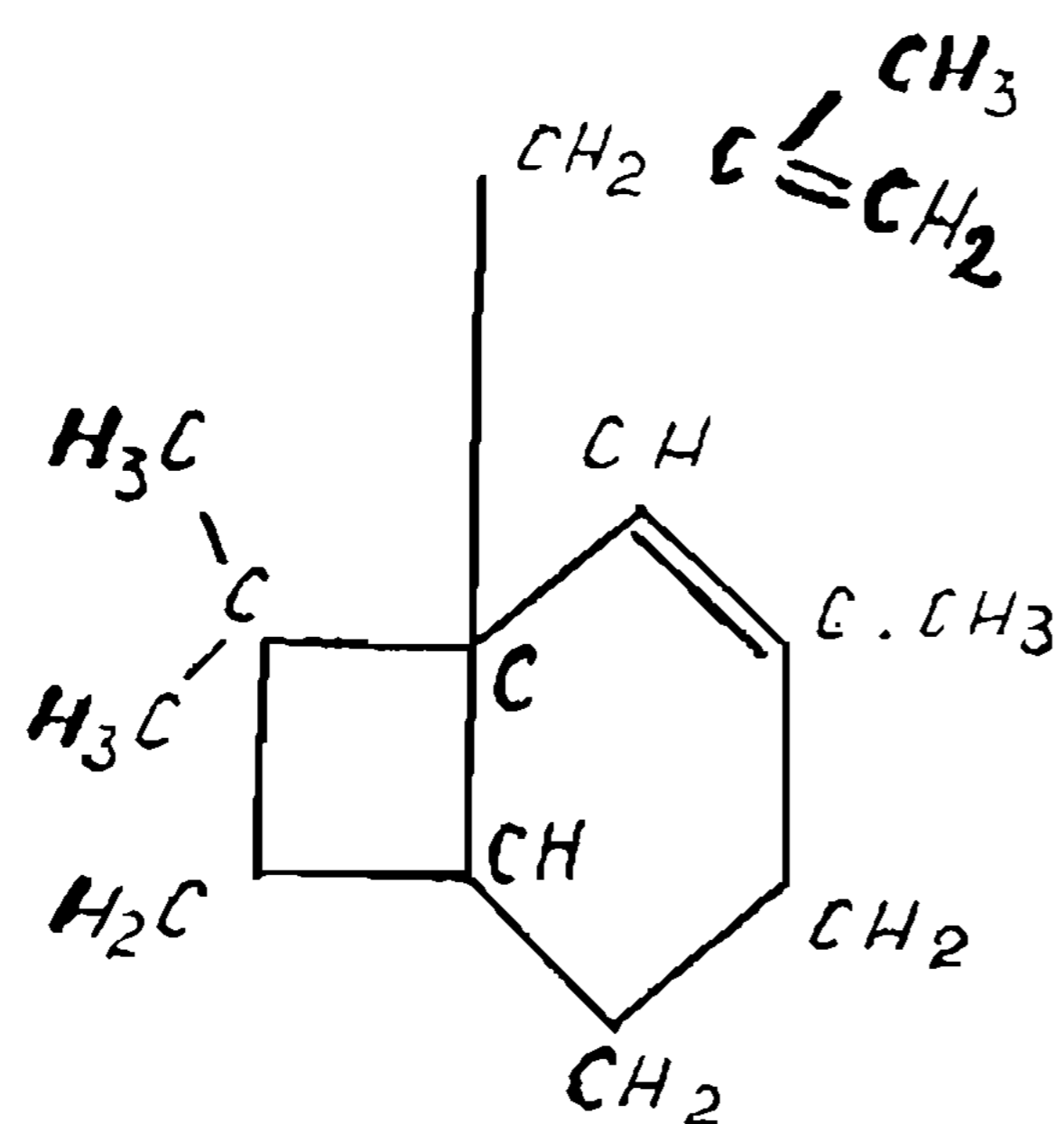
Ainda não se chegou a uma conclusão definitiva, sobre a constituição dos cariofilenos, sendo as fórmulas químicas mais aceitas atualmente, as seguintes:



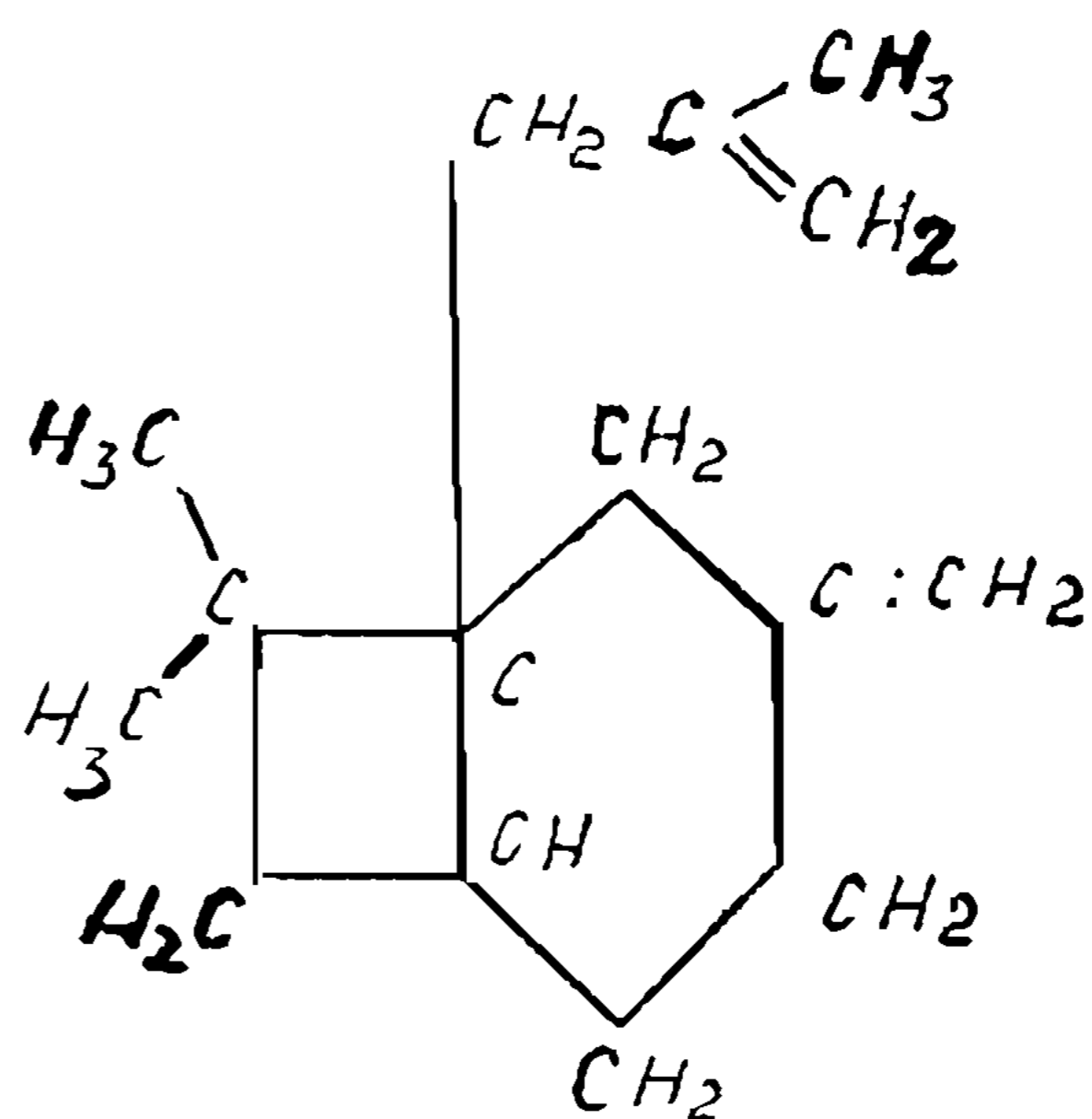
$\beta$ -cariofileno (Ruzicka)



$\gamma$ -cariofileno (Ruzicka)



beta-cariofileno  
(Ramage e Simonsen)



gama-cariofileno  
(Ramage e Simonsen)

O cariofileno apresenta ação terapeutica indiscutivel nas infecções produzidas por estafilococos, especialmente quando aplicado em feridas infectadas; sua ação é porém limitada pela insolubilidade que apresenta, nos liquidos organicos. Desejando aumentar essa atividade terapeutica e ao mesmo tempo permitir um mais intimo contato com a superficie infectada, estudamos as diversas possibilidades de transformá-lo em derivado solúvel.

*Metodo de preparo do sulfonato.* Dissolvendo-se partes eguaes em peso, de cariofileno e anidrido acetico, e adicionando-se lentamente, em pequenas porções, a quantidade correspondente a uma mol de acido sulfurico concentrado (des. 1,84), obtem-se reação imediata com forte aumento da temperatura do liquido. A temperatura não deve exceder a 60° C afim de evitar o desprendimento de anidrido sulfuroso. Uma vez terminada a adição de acido sulfurico, deixa-se em repouso durante 24 horas. Ao liquido preto azulado formado pela mistura de reagentes, adiciona-se então tres partes de alcool etilico anidro e aquece-se em banho maria, durante 3 horas, com refluxo.

Procede-se à distilação do acetato de etila formado e do excesso de alcool, aquecendo-se ainda em banho maria. Obtem-se assim o acido cariofileno sulfonico, que se dissolve em agua e agita-se com eter afim de libertá-lo de pequena quantidade de um produto oleoso, formado durante a reação.

Pode-se tomar uma prova dessa solução e dosar a acidez, obtendo-se a concentração da solução em acido sulfonico. Neutralisa-se com a quantidade calculada de hidroxido de sodio, para preparar o sal correspondente.

Esse sal de sodio é solúvel em cloroformio, podendo pois ser purificado e concentrado, extraindo-se com esse liquido. Sua solução em agua é neutra e estavel, comportando-se como as soluções de saes de acidos fortes. Não conseguimos obtê-lo em estado cristalino.

No presente trabalho interessa-nos particularmente a ação antoprotoeolítica exercida por esse sal de sodio, não só nas infecções locais pro-

duzidas pelo estafilococos, como in vitro, impedindo a digestão e consequente liquefação do meio de gelatina em que é semeado esse germe. A ação anti-proteolítica se traduz pela inibição gradual, proporcional à concentração, da atividade proteolítica do germe, inibição essa que não é acompanhada de ação antisetica, pois que o germe continua a vegetar no meio, mesmo nas mais fortes concentrações.

Empregamos nas nossas experiencias o Bacto Nutrient Gelatin Difco, distribuidos em tubos de 1cm. de diametro, contendo cada tubo o total de 2 cm<sup>3</sup>. de meio e respectivamente, em cada tubo, quantidades crescentes de cariofileno sulfonato de sodio, dissolvido no meio, antes da esterilização dos tubos a 110°, 20 minutos, obtendo-se assim as diferentes concentrações.

A semeadura do estafilococo foi realizada, selecionando-se uma amostra cuja atividade proteolítica se manifestasse pela capacidade de liquefazer em 24 horas, cerca de 1/3 da camada do meio de gelatina, sem adição do sal inibidor. Da cultura de 24 horas desse germe, em agar, se fez uma suspensão em agua fisiologica, de modo a apresentar uma ligeira turvação.

Todos os tubos, inclusive o testemunha, foram inoculados com uma gota desta suspensão, sendo a leitura efetuada após tres dias de crescimento à temperatura ambiente de cerca de 26°.

Os tubos que se vêm na fotografia foram preparados com as seguintes concentrações de cariofileno sulfonato de sodio:

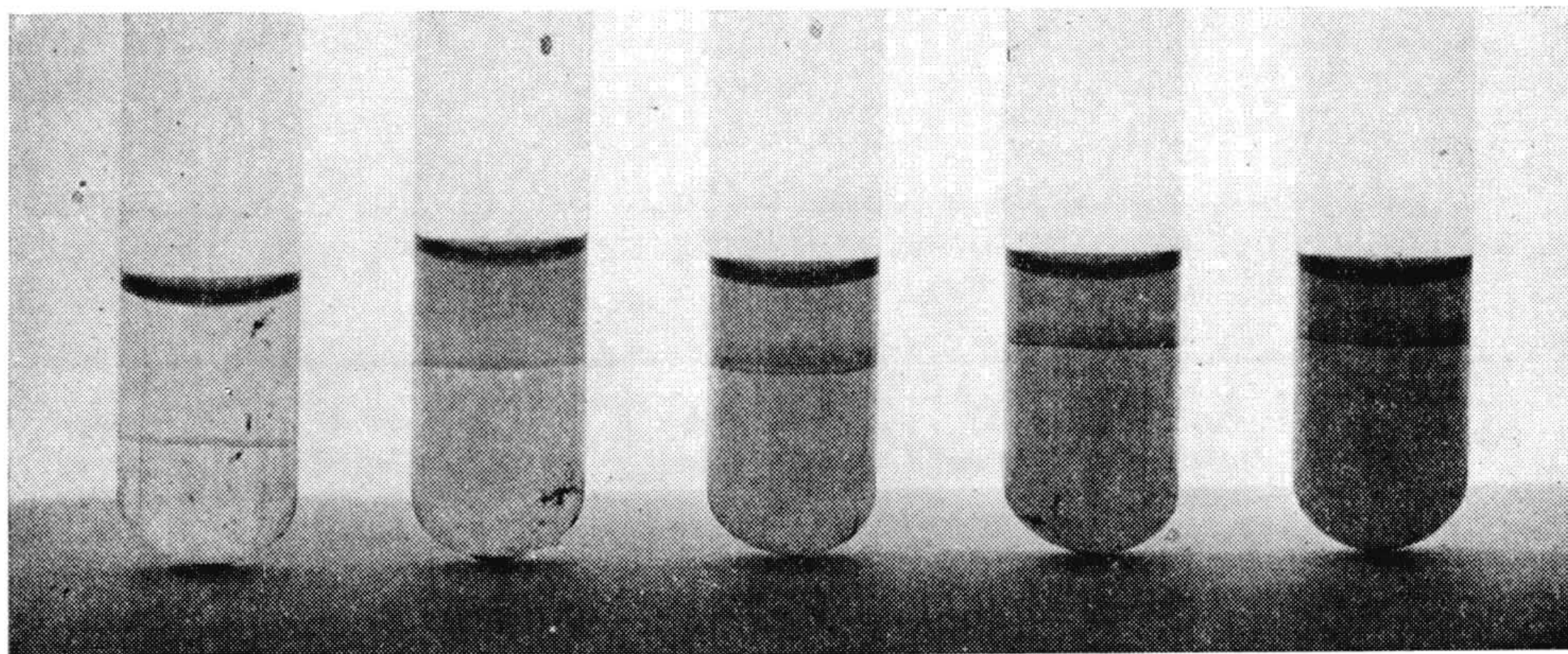
TUBO	Profundidade do crescimento e grau de liquefação	Percentagem do sulfonato	Centigramas do sulfonato em 2 cm <sup>o</sup>	Miligramas em 1 mm. da superfície
1	1 cm. líquido	0	0	0
2	0,7 pastoso	0,5	1	0,5
3	0,5 semi-sólido	1	2	1
4	0,4 sólido	1,5	3	1,5
5	0,4 sólido	2	4	2

Na apreciação dos resultados é necessario considerar que somente a camada superficial, sobre a qual é depositado o germe, exerce sua atividade antiproteolítica. Dessa maneira, sendo a profundidade do meio de 2 cms., atua sobre o germe em suspensão, apenas um miligrama do sal, sendo a inibição completa com 1,5 miligramas.

Egualmente estudamos a possibilidade de dosar o poder antiproteolítico pelo metodo da placa, colocando-se a solução do sulfonato em aneis como se faz para dosagem de antibioticos, e deixando o liquido se infiltrar no meio de gelatina, durante a noite, para então banhar superficie da placa com uma suspensão bem fraca de estafilococo. Vinte e quatro horas depois de semeadura, o meio de gelatina se liquefaz em

redor dos aneis, permanecendo ilhotas do meio de cultura, não atacado, de dimensões proporcionaes à diluição do sal. Contudo este metodo apresenta certas dificuldades, devendo a temperatura ambiente ser mantida a 24°, afim de que o meio de cultura permaneça sempre solido.

O interesse desta comunicação, reside particularmente na demonstração experimental da ação inibidora sobre a principal atividade dos estafilococos patogenicos, isto é, a proteolise dos tecidos, exercida por derivados possuindo uma constituição quimica especial, e sabidamente portadores de ação terapeutica.



A fotografia apresenta tubos contendo 2 cm<sup>3</sup> de Bacto Nutrient Gelatin Difco, sendo o primeiro, testemunho, e os demais, com quantidades crescentes de sal de sodio do acido cariofileno sulfonico, inoculados com estafilococo.

O meio não sendo totalmente solido á temperatura ambiente (26°), o germe se desenvolveu em profundidade, sem liquefazer o meio, a não ser no test. e no 1.º tubo, no qual a menor profundidade, já denota a ação antiproteolitica do composto sulfonico. A interpretação dos resultados e a fotografia foram feitas após permanecerem os tubos, meia hora no refrigerador.

---