

Instituto Nacional de Ciencias Médicas.  
Sección de Farmacología, Barcelona  
(Prof. Francisco G. Valdecasas)

## **Dimetilbenzoilsulfanilamida. Acción *in vitro* y especificidad**

SILVANO ROSSI

En la farmacología de las sulfamidas, sigue siendo objeto de interés el tema de la actividad de los derivados sulfamídicos frente a distintos gérmenes, tema que linda con la tan debatida cuestión de la especificidad.

Algunos compuestos demuestran particular actividad sobre unos gérmenes; otros microorganismos presentan una quimiorresistencia casi absoluta a todas las sulfamidas hasta ahora conocidas; a veces las sensibilidades *in vitro* e *in vivo* de un mismo germen frente al mismo quimioterápico no ofrecen paralelismo alguno.

Estos hechos tienen una gran importancia teórica, ya que constituyen el mayor obstáculo a una teoría unitaria del mecanismo de acción de las sulfamidas, llegando incluso a invalidar la que hasta ahora ofrece mayores visos de realidad: la enzimático-metabólica.

Aun desde el punto de vista meramente químico, resulta interesante el problema; en efecto, recientemente han aparecido numerosos trabajos, destinados a aclarar las relaciones entre constitución química y acción quimioterápica, sin que haya sido posible comprobar que una determinada cadena, grupo o función confiera mayor actividad a un derivado. Así, LAEUGER y MARTÍN (21), basándose en numerosos ejemplos sacados del campo de las vitaminas, hormonas y quimioterápicos, especialmente sulfamidas, han demostrado la inexistencia de leyes que permitan prever con certeza la actividad de un producto obtenido mediante determinada modificación de una fórmula conocida, hecho que el mismo EHRLICH había ya proclamado.

Con el fin de aportar observaciones experimentales a tan candente problema, hemos emprendido el estudio de la acción antibacteriana *in vitro* de un nuevo derivado sulfonamídico: la 3,4 dimetilbenzoilsulfanilamida (Irgafeno) sobre el estafilococo áureo, eligiendo este microorganismo por ser uno de los menos sensibles a la acción de las sulfamidas, sobre todo de las primitivas.

Dada la gran variedad de resultados que nos brinda la literatura a propósito de las investigaciones *in vitro*, hemos pensado repetir los experimentos un número de veces suficiente para poder expresar en forma estadística el fenómeno de la bacteriostasis con su variabilidad inherente a la naturaleza biológica del objeto de estudio y el error de observación.

Nos hemos propuesto también determinar la potencia relativa del Irgafeno, comparando su actividad con la de otras sulfamidas en las mismas condiciones experimentales.

El objeto del presente trabajo ha sido, por lo tanto, determinar la concentración mínima inhibidora de Irgafeno, sulfamidotiazol (ST) y sulfanilamida. Por concentración mínima inhibidora se entiende la que inhibe todo crecimiento visible a las 24 horas de la siembra (CMI 24).

## TECNICA

### a) Concentraciones estudiadas.

Fueron estudiadas las siguientes concentraciones:

Sulfanilamida:	250, 500, 750, 1.000 mgr. %.
Irgafeno:	75, 85, 100, 125, 150, 175, 185, 200 mgr. %.
Sulfamidotiazol:	75, 85, 100, 125, 150, 175, 185, 200, 250, 275, 330, 400, 450, 475, 500

Las soluciones iniciales, renovadas en cada experimento, fueron: para la sulfanilamida, 20 %; para el Irgafeno, 5 %, y para el ST 5 y 20 %.

Las sulfamidas se diluyen en agar hasta el volumen total de 10 c. c.

Se emplearon preparados del comercio. Los ensayos con ST fueron repetidos con dos productos de igual fórmula y distinta marca.

b) *Selección y clasificación de los gérmenes.*

Para los ensayos *in vitro* se han empleado gérmenes procedentes de lesiones no tratadas con sulfamidas o antibióticos, ya que estos medicamentos determinan en los microbios un aumento de resistencia, ya conocido y estudiado, que dificulta la interpretación de resultados comparativos.

Han sido examinadas con este fin 25 cepas de estafilococo, clasificándolas según sus características de crecimiento, fermentativas, toxínicas y cromogénicas, eligiendo para el presente trabajo una cepa de *Staphylococcus aureus* (D<sub>2</sub>), cuyas características son :

- reacción de coagulación del plasma humano. . . positiva
- hemólisis de hematíes de conejo . . . . . positiva
- fermentación del manitol. . . . . positiva

Durante todo el curso de la experimentación, que requirió varios meses, se mantuvo constante la sensibilidad de la cepa.

c) *Siembra en agar-sulfamida.*

Se disponen tubos que contienen 10 c. c. de agar simple preparado con extracto sintético de carne al 0,5 % y peptona a la concentración del 1 % (se reseñan estos datos para dar idea del contenido antisulfamídico del material empleado, ya que su concentración influye grandemente en los resultados absolutos).

El pH, determinado colorimétricamente, osciló entre 7,6—7,9; así, pues, sus variaciones no excedieron del límite máximo de 0,3 unidades que, según HARRIS y KOHN (12), no interfiere en la valoración de los resultados.

Se somete el agar a la temperatura de fusión y se le deja enfriar lentamente en baño de María hasta la temperatura de 50° C., indicada por un termómetro situado en tubo de agar control. Estabilizada la temperatura se añade a cada tubo la sulfamida hasta obtener las concentraciones indicadas.

Los tubos de agar fundido, siempre a 50°, se siembran con un número conocido de gérmenes (300 aproximadamente); este número se obtiene con bastante precisión diluyendo, antes de la siembra en agar, una asa de cultivo de caldo de 24 h. en 10 centímetros cúbicos de caldo; la cantidad que se siembra de esta dilución es asimismo una asa. Los tubos sembrados se

vierten en cápsulas de Petri, que se trasladan a la estufa, donde permanecen 24 horas a temperatura constante de 37° C.

Cada concentración fué ensayada 20 veces para obtener datos estadísticos.

d) *Lectura y valoración de los resultados.*

La lectura se hace a las 24 horas.

Se interpretó como resultado positivo la falta absoluta de desarrollo bacteriano visible, es decir, la imposibilidad de identificar, a simple vista o con una lupa de 5 dioptrías, colonias con las características morfológicas y cromogénicas propias del estafilococo dorado. La presencia de una o más colonias se clasifica como resultado negativo.

El coeficiente de actividad de los derivados estudiados se ha determinado dividiendo la CMI 24 de una sulfamida por la CMI 24 de otra.

## RESULTADOS

La CMI 24 para la sulfanilamida no pudo determinarse, ya que ni siquiera la más alta de las concentraciones estudiadas dió ningún resultado positivo.

La CMI 24 de Irgafeno resultó ser de 185 mgr. %.

La CMI 24 de ST fué de 475 mgr. %. Los dos sulfamido-tiazoles empleados, dieron resultados prácticamente iguales.

Como que a veces se han presentado resultados positivos con concentraciones inferiores a las referidas para ambas sulfamidas, hemos optado por expresar en forma estadística la variabilidad de este fenómeno, representándolo en forma de gráfica: en ordenadas el tanto por ciento de resultados positivos, en abscisas la escala de concentración (gráfica núm. 1).

Esta gráfica expresa lo que en otros trabajos se ha definido en forma de valores límites y valores medios. Los valores límites para el Irgafeno serían 125-185 mgr. %; para el ST, 275-475 mgr. %.

El recuento de las colonias ha demostrado que el número de gérmenes que se desarrollan en presencia de sulfamidas disminuye con el aumento de concentración de éstas. En algunos casos se han notado excepciones, lo que nos ha inducido a no aceptar un número determinado de colonias como índice de la actividad de una determinada concentración. Por ejemplo,

concentraciones elevadas han permitido a veces el desarrollo de numerosas colonias al límite de la visibilidad y, otras veces, el de una sola colonia.

Más constante es la disminución del *tamaño* de las colonias por aumento de concentración; este aspecto morfológico del crecimiento es sensible ya a cantidades de sulfamidas muy por debajo de los valores que hemos indicado como límite inferior de actividad.

El coeficiente sulfamidotiazólico del Irgafeno, que aquí determinamos en lugar del coeficiente sulfanilamídico, por no ser la sulfanilamida activa contra el estafilococo, es por lo tanto:

$$\frac{\text{CMI 24 sulfamidotiazol}}{\text{CMI 24 Irgafeno}} = \frac{475}{185} = 2,56.$$

En muchos de los experimentos efectuados se ha registrado fotográficamente el desarrollo bacteriano a las 24 horas. El estudio de las fotografías constituyó el fundamento de nuestras afirmaciones sobre el número y tamaño de las colonias. Sin embargo, renunciamos a la publicación de estas fotografías, porque el crecimiento bacteriano a las 24 horas y en presencia de sulfamidas es tan exiguo que su reproducción fotográfica a la escala impuesta por los exigencias tipográficas no resulta demostrativa para el lector.

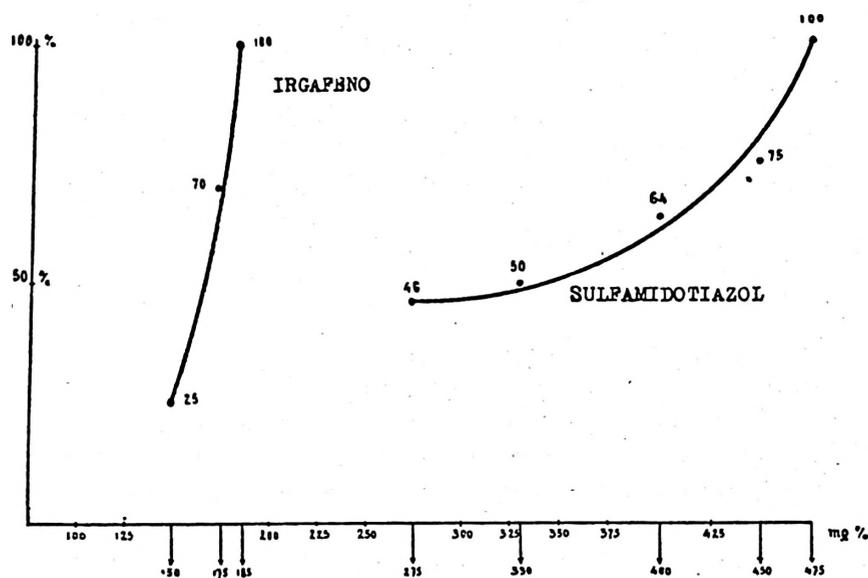
## DISCUSION

Los resultados referidos plantean la discusión de los siguientes puntos:

- 1) consideraciones generales sobre la valoración de la bacteriostasis;
- 2) consideraciones relativas a la actividad *in vitro* de las sulfamidas estudiadas.

1) El método empleado por nosotros para la determinación de la CMI 24 nos ha permitido efectuar algunas observaciones de orden general sobre la valoración de los resultados de bacteriostasis, observaciones indiscutiblemente susceptibles de ampliación ulterior y confirmación experimental.

En primer lugar destaca claramente la imposibilidad práctica de determinar con exactitud, mediante pocos experimentos, una dosis bacteriostática *in vitro*; efectivamente, dos observaciones aisladas arrojan a veces cifras muy diferentes entre sí.



Graf. 1

El valor de la dosis bacteriostática es una variable dependiente de la individualidad biológica del organismo estudiado, es decir, de su constitución y procesos metabólicos. Precisa tener en cuenta además un factor eventual sobreañadido constituido por el error, sea de técnica, sea de interpretación.

Fácil es concluir, por todo ello, que la determinación de la concentración inhibidora ha de revestir una forma estadística. De este modo, más que valores límites o valores medios se obtendrán curvas en las que es posible identificar un valor correspondiente a una «zona sensible» de la curva, zona en la que toda variación, aun mínima, dará lugar a una gran diferencia en los resultados. El valor referido constituirá, por tanto, un medio muy sensible para el estudio analítico.

Como se ve, estos conceptos son análogos a los adoptados hace ya tiempo por TREVAN, BEHRENS, GADDUM, etc., para la determinación de la dosis letal.

2) Pasando ahora a la consideración de los resultados obtenidos en el presente trabajo, hemos de referirnos en primer lugar a las diferencias entre los valores bacteriostáticos correspondientes a los dos derivados sulfonamídicos que han dado resultados positivos: Irgafeno y ST.

No se trata sólo de diferencias absolutas en cuanto a las CMI 24; del estudio de ambas curvas se deduce que la actividad del Irgafeno está comprendida entre límites más cercanos y por consiguiente la curva es más sensible en toda su extensión, mientras que la actividad del ST es más difusa, existiendo en la curva zonas de sensibilidad bastante escasa.

Tomando como base estas observaciones, cabe afirmar por consiguiente que el Irgafeno tiene una acción más específica contra el estafilococo.

La controversia de que ha sido y es objeto el concepto estricto de especificidad en nada merma su notable utilidad práctica.

El problema de la especificidad de las sulfamidas está hoy muy lejos de su resolución; podemos sin duda afirmar que una determinada sulfamida tiene acción específica sobre un germen en el sentido de que es relativamente más activa que otra, pues esto se corresponde con los hechos clínicos cotidianos y resulta además del detallado estudio *in vivo* de MARSHALL y col. (25); sin embargo, no podemos afirmar que actúe sobre el microorganismo con mecanismo específico. Numerosas investigaciones demuestran que es altamente improbable la existencia de un germen en cuyas funciones vitales no interfieran las sulfamidas de modo más o menos acentuado.

WYSS, GRUBAUGH y SCHMELKES (33) afirman que el antagonismo entre la sulfamida y el ácido p-aminobenzoico es directo e independiente del germen empleado; ROSE y FOX (30) llegan incluso a decir que es independiente del número de gérmenes presentes.

Estas observaciones adolecen, a nuestro entender, del defecto de tener en cuenta exclusivamente el antagonismo sulfamida-ácido p-aminobenzoico como exponente único del complejo de fenómenos que se desarrollan en la superficie de la célula bacteriana y conducen, o no, al efecto biológico. La interacción entre los tres elementos: sulfamida, metabolitos y enzimas celulares, consta de un gran número de fenómenos

elementales de los cuales hoy se conocen ya algunos más que el simple antagonismo sulfamida p-aminobenzoico, si bien éste es el más importante y basta para explicar la resistencia adquirida y la diferencia de sensibilidad entre gérmenes pertenecientes a especies distintas y hasta a cepas de la misma especie. Por ahora, las teorías aludidas no explican tampoco los casos, cada vez más numerosos (8, 9) de sulfamidas para las cuales el ácido p-aminobenzoico no es antagonista, si bien cabe pensar que puede llegar a conocerse para ellas un metabolito que actúe como el ácido p-aminobenzoico.

Por tanto, está plenamente justificado el que muchos investigadores intenten descubrir en la constitución y propiedades de la molécula sulfamídica la causa eventual de un posible aumento de la actividad de estos fármacos.

No nos corresponde, en la presente comunicación, rehacer la historia ni analizar todas las observaciones y teorías emitidas en este terreno. Refiriéndonos al trabajo de LAEUGER y MARTÍN (21) sobre las relaciones entre especificidad química y mecanismo de acción, decíamos ya en la introducción que no se conoce por el momento modificación alguna de la fórmula de las sulfamidas susceptible de llevarnos, en forma metódica y con regularidad, a un aumento de actividad quimioterápica; esta falta absoluta de reglas se extiende también al radical substituído en  $N_1$ , como se ha comprobado recientemente también en el caso de las sulfadiazinas (31).

Las constantes de disociación básica y ácida han merecido una gran atención; el número de trabajos efectuados sobre este tema es bastante elevado y en general hay unanimidad respecto al hecho de que el grado de disociación influye aumentando la actividad de una sulfamida. Ahora bien, algunos fenómenos puestos de relieve por la investigación físico-química y especialmente la existencia de derivados sulfamídicos indisociables, pero dotados de una acción considerable, como la sulfoguanidina, impiden establecer una relación constante de causa a efecto entre el grado de disociación iónica y la intensidad de acción.

Muchas son las aportaciones teóricas aparecidas en estos últimos años sobre la relación entre la constitución química y la actividad de las sulfamidas.

El grado de disociación ácida y la negativa del grupo sul-

fónico son considerados por BELL y ROBLIN (1, 2) como los dos factores fundamentales de la actividad de una sulfonamida. Según estos autores, cuanto más negativo es el grupo  $\text{SO}_2$ , mayor resulta su parecido con el grupo  $\text{CO}_2$  del ácido p-aminobenzoico, grupo que, a los pH fisiológicos, posee precisamente una intensa carga negativa.

KUMLER y DANIELS (19) consideran la negatividad del grupo  $\text{SO}_2$  como un factor dependiente de la resonancia que presentan los compuestos en cuestión y que sería la verdadera causa de su actividad. En efecto, según los autores citados, la condición necesaria para una acción óptima es una forma tautómera de la sulfonamida con la amina en posición para, situada en el mismo plano y dotada de la mayor carga positiva posible. Para reforzar tal hipótesis, los autores aducen ejemplos de hechos análogos en la química de las anilinas. La teoría de la forma tautómera con un grupo coplanar es aplicable también a las monoaminoacridinas.

Por otra parte, el radical sustituido en  $\text{N}_1$  puede contribuir también a que el derivado asuma la disposición considerada antes como más favorable, puesto que si dicho radical, debido a su electropositividad, actúa como aceptor de electrones y con ello da lugar a ionización, se hará mayor la carga negativa de  $\text{SO}_2$ , con el consiguiente aumento de positividad de la amina en posición para. PULVER y MARTÍN (28) han publicado un detenido estudio a propósito de la influencia del acilo sustituido en  $\text{N}_1$  sobre las propiedades biológicas del derivado sulfamídico.

KUMLER y DANIELS intentan dar solidez a su teoría, no sólo aduciendo ejemplos de imposible explicación mediante las ideas de BELL y ROBLIN, sino basándose también en los brillantes experimentos de BRADBURY y JORDAN (5) a quienes el estudio de la motilidad electroforética del *B. coli* en presencia de quimioterápicos ha revelado que isómeros no resonantes de sulfamidas activas no determinan alteración de la motilidad de los gérmenes.

GREEN y BIELSCHOWSKY (10) habían demostrado ya que los compuestos provistos de un grupo amino en posición para y carentes de grupo sulfónico, como el p-aminotiofenol, actúan también como antagonista del ácido p-aminobenzoico, hecho que confirma la importancia de esta amina y que coincide con

los numerosos estudios demostrativos de que, salvo contadas excepciones, la sustitución de dicho grupo determina la inactividad del producto. Las observaciones de GREEN y BIELSCHOWSKY, citadas por KUMLER y colaboradores, coinciden con los estudios de HIRSCH (13), quien demostró el «efecto sulfamídico» de compuestos desprovistos del grupo  $\text{SO}_2$ , como la p-aminobenzamida entre otros. Estos compuestos son también antagonistas del ácido p-aminobenzoico. En trabajos más recientes se encuentran más aportaciones en este sentido: KUHN, MOELLER y WENDT (17) describen el 4:4' diaminobencilo que, sin poseer el grupo sulfónico, actúa como antibacteriano frente al estafilococo, entre otros gérmenes, y además es antagonista al ácido p-aminobenzoico.

Hay otros compuestos carentes de grupo sulfónico, como los derivados del p-aminobenzoico descritos por MARTÍN y ROSE (26), que poseen también actividad antibacteriana. JOHNSON, GREEN y PAULI (15), por otra parte, se han ocupado de la acción antibacteriana de los compuestos derivados del p-aminobenzoico y otros de estructura análoga. Estos autores concluyen que la acción de dichos compuestos depende de la actividad química de los grupos funcionales y de su semejanza con el ácido p-aminobenzoico por lo que se refiere a las dimensiones físicas de su molécula.

Como no podía por menos de ocurrir, las ideas de KUMLER y colaboradores (18, 19, 20), han suscitado controversias y, así, BORDWELL y KLOTZ (4) opinan que las determinaciones espectroscópicas de KUMLER y STRAIT (20) son más bien susceptibles de una interpretación desfavorable en cuanto a su propia teoría, es decir, que más que apoyarla la desacreditarían.

BORDWELL y KLOTZ tienden a subestimar la inducción del radical  $\text{SO}_2$  y citan ejemplos del derivado vinílico, totalmente inactivo contrariamente a cuanto cabría esperar aplicando la teoría de KUMLER y colaboradores.

Las investigaciones de KLOTZ y GUTMAN (16) sobre la constante de disociación del complejo enzima-sulfamida ofrecen un interés más directo en relación con el presente trabajo; en efecto, estos autores han obtenido para la  $N_1$  benzoilsulfonamida valores muy elevados, netamente superiores a los correspondientes al ST y demás sulfamidas estudiadas.

Respecto al problema de la especificidad, el presente trabajo aporta el dato de la diferencia en el desarrollo de las curvas obtenidas con Irgafeno y ST; valorarla con vistas a una afirmación de orden general parece aventurado. Sería oportuno insistir en este tema, analizando la acción biológica a través de una estadística más sensible que la de la obtención de un efecto todo-o-nada. Eventualmente deberíanse emplear medios de cultivo sintéticos, lo que nos ha sido imposible en el presente trabajo, y comparar los resultados obtenidos con diferentes medios (27).

Al buscar en la literatura trabajos sobre la actividad *in vitro* del Irgafeno para establecer una comparación con los resultados obtenidos por nosotros, nos encontramos con que el número de tales trabajos es sumamente escaso.

En efecto, aparte de los ya citados, de carácter eminentemente químico y de los estudios sobre la farmacología del Irgafeno, citados por CAÑADELL (6) en su trabajo experimental (efectuado, como el presente, bajo la dirección del pr. dr. VALDECASAS), sólo han llegado a nuestro conocimiento las investigaciones de HIRSCH (14), PULVER y SUTER (29) y el estudio de BLISS y DEITZ (3); pero como sea que HIRSCH, por una parte, y PULVER y SUTER por otra, han empleado el método manométrico, sólo podemos referirnos comparativamente a los de BLISS y DEITZ. Estos autores han estudiado la acción *in vitro* de la sulfanilamidopirimidina, sulfanilamidopirazina, sulfanilamidometilpirimidina, dimetilacroil-sulfanilamida (Irgamid), Irgafeno, aminometilbenzensulfonamida y sulfanilamida, contra distintos gérmenes.

Según Eleanor BLISS y Helen DEITZ, la concentración mínima inhibidora a las 24 horas es, para el estafilococo, de 200 miligramos por 100, o sea que sus resultados son cuantitativamente iguales a los nuestros, aunque tal vez no del todo superponibles habida cuenta de las grandes diferencias entre la técnica seguida por estas investigaciones y la nuestra: una de ellas es la composición de su medio de cultivo, constituido por peptona, destrosa y agua, según la prescripción de WHITE (32).

El número de gérmenes sembrado en nuestros experimentos no difiere sensiblemente del que BLISS y DEITZ indican en su trabajo (de 15 a 100 microorganismos en 5 c. c. de medio).

Creemos por otra parte que la exigua diferencia existente no puede influir en la valoración comparativa entre los resultados finales de las autoras americanas y los nuestros.

En realidad, numerosos trabajos indican que la cantidad de gérmenes presentes es inversamente proporcional al grado de inhibición del crecimiento producido por la sulfamida, es decir, que volúmenes de siembra mayores requieren concentraciones más elevadas del quimioterápico. Se deduce esto, por ejemplo, de los datos de LIBBY (24), quien demostró que la inhibición varía en un 20-30 %, según el germen y la sulfamida usados, cuando se pasa de una siembra de 12,5 millones a otra de 50 millones. No obstante, parece probado que, cuando se trabaja con pequeñas siembras, la densidad de población no interfiere en el proceso del bacteriostasis.

En nuestros experimentos hemos sembrado los gérmenes en agar caliente para poderlos mezclar al medio. Con este procedimiento hemos sumado a la acción bacteriostática de las sulfamidas la acción igualmente bacteriostática del calor y este hecho puede ser una de las causas de la ligera discrepancia existente entre los datos de BLISS y DEITZ y los nuestros; en efecto, hemos podido demostrar con experimentos que aquí no detallamos, que, sembrando en superficie (agar frío), se requieren, para obtener la bacteriostasis absoluta, concentraciones ligeramente más elevadas que sembrando en agar caliente. Así, por ejemplo, en la siembra en caliente las CMI 24 son para el Irgafeno 185 mg. % y para el ST 475 %; en cambio, en frío, las CMI 24 son respectivamente 200 mg. % y 500 miligramos por 100. Es conveniente, por tanto, destacar el hecho de que la interferencia, o mejor el sinergismo del calor, a juzgar por las diferencias de concentraciones necesarias para la bacteriostasis absoluta, no ha representado en nuestro trabajo un factor de apreciable importancia.

Hemos practicado también experimentos de control a temperaturas varias comprendidas entre los 47° y 60° (\*) aumentando cada vez un grado. Hemos podido averiguar que de los 47° hasta los 57° los resultados obtenidos con los productos ensayados se mantienen no sólo proporcionales, sino incluso

---

(\*) Hay que tener presente que el estafilococo es uno de los gérmenes más resistentes al calor; hasta el punto de que tolera una temperatura de 60° durante media hora.

iguales, a juzgar por las características, tamaño y número de las colonias que crecen en presencia de concentraciones infra-liminales. Para ninguna de las temperaturas y concentraciones se ha podido demostrar un sinergismo electivo entre sulfamida y calor.

Por encima de los 57° empieza a notarse una sumación de efectos, llegándose a obtener, con concentraciones de 125-150 miligramos por 100 de Irgafeno y 400-450 mg. % de ST, bacteriostasis de hasta 15 días de duración. Concentraciones menores, como 75 mg. % de Irgafeno y 200 mg. % de ST dan lugar a bacteriostasis de 48 horas. Es conveniente subrayar que los gérmenes están en contacto con agar a temperatura superior a 37° durante un tiempo muy limitado, 25-30 segundos, que es el necesario para sembrar y verter en cápsulas; de 1 a 2 minutos hasta la solidificación del agar, lograda la cual se llevan las cápsulas a la estufa a temperatura de 37°.

Por lo tanto, nuestros experimentos aportan ulteriores datos confirmativos de los antiguos y conocidos estudios de la acción inhibidora del calor sobre el desarrollo bacteriano. Ambos agentes, calor y sulfamidas, manifiestan el mismo efecto: alargamiento de la fase lenta de crecimiento.

El sinergismo entre las sulfamidas y el calor *in vitro* es objeto de numerosos estudios a los que remitimos al lector. Consideramos de interés las observaciones siguientes: el aumento de temperatura puede determinar no sólo un aumento de la actividad bacteriostática, sino también la aparición de una acción bactericida; la muerte por calor de los gonococos se acelera en presencia de sulfamidas, aun en cantidades muy pequeñas; al aumentar la temperatura por encima de 37°, el ácido p-aminobenzoico es cada vez menos antagonista de las sulfamidas (22) y llega incluso a asumir una acción sulfamídica a la temperatura de 40° en el caso particular del estreptococo piógeno (23).

*In vivo* existen numerosas interferencias que hacen difícil emitir un juicio sobre el grado de intervención del sinergismo. No obstante, se conocen indicaciones del uso combinado de la piretoterapia y las sulfamidas: por ejemplo, el caso de las infecciones gonocócicas; HAMILTON y HAMILTON (11) han estudiado el efecto de la aplicación conjunta del calor y las sulfamidas en la endocarditis lenta.

El sinergismo que tan concisamente tratarnos aquí, merece un estudio más detenido a la luz de los conocimientos modernos sobre el metabolismo bacteriano y sus relaciones enzimáticas con los medios. EDWARDS y RETTGER (7) han demostrado la correlación existente entre la temperatura mínima de destrucción de las enzimas respiratorias y la máxima de crecimiento; en otros términos, que cuando se destruyen las enzimas respiratorias (catalasa, succinodeshidrasa, citocromo) cesa el crecimiento bacteriano.

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento al profesor F. G. VALDECASAS, cuyos consejos y orientaciones nos han sido de sumo valor en el curso de la presente investigación.

Agradecemos asimismo a la señorita Nieves Fernández, estudiante de Química, su eficaz colaboración técnica.

#### Resumen

El autor ha intentado determinar las concentraciones de sulfanilamida, sulfamidotiazol y dimetilbenzoilsulfanilamida (Irgafeno) necesarias para inhibir in vitro y de modo total el desarrollo del *Staphylococcus aureus* durante 24 horas y en el 100 % de casos.

En ningún caso ha sido posible obtener con la sulfanilamida una bacteriostasis del tipo descrito; para el sulfamidotiazol y el Irgafeno, las concentraciones necesarias han sido respectivamente de 475 miligramos % y 175 mgr. %.

El autor expone sus resultados en forma estadístico-gráfica, con lo que obtiene curvas de acción cuyo valor discute, sobre todo, con relación a la cuestión de la especificidad de las sulfamidas; a este respecto analiza las aportaciones más recientes de la Química teórica. También se discute el método de valoración de la concentración bacteriostática en general.

Además de discutir las condiciones de técnica, el autor se ocupa del sinergismo entre calor y sulfamidas, a cuyo conocimiento contribuye con datos experimentales.

#### Summary

The concentration of Sulfanilamide, Sulphathiazole and Irgafen necessary to prevent in vitro and completely the development of the *Staphylococcus aureus* during 24 hours and in 100 % of the cases was determined.

By concentrations of Sulfanilamide up to 1000 mgm. % a bacteriostasis of the defined type was never obtained being necessary to that object 475 mgm. % of Sulphathiazole and 185 mgm. % of Irgafen.

The results are shown in a graphic statistics and enables to obtain curves of action whose importance is discussed above all in connection with the controversy of the specificity of sulphonamides. As regards this, the most recent contributions of theoretic chemistry are mentioned.

The commonly used methods of valuation of the bacteriostatic concentration is also object of criticism.

The technics is discussed as well as the synergism between heat and Sulphonamides to which knowledge new experimental data are produced.

### Résumé

L'auteur a cherché à déterminer les concentrations de sulfanilamide, sulfanilamidothiazol et diméthylbenzoylsulfanilamide (Irgafen) nécessaires à l'inhibition totale «in vitro», du développement du *Staphylococcus aureus*, durant 24 heures, et dans le 100 % des cas.

Dans aucun des cas il n'a été possible d'obtenir avec la sulfanilamide une bacteriostase du type décrit; pour le sulfanilamidothiazol et l'Irgafen, les concentrations nécessaires ont été respectivement de 475 mg % et de 185 mg %.

L'auteur expose ses résultats en forme statistico-graphique, grâce à quoi il obtient des courbes d'action, dont il discute la valeur, surtout quant à la spécificité des sulfamides; sous ce rapport, il analyse les plus récentes apports de la chimie théorique.

Il discute aussi la méthode d'évaluation de la concentration bacteriostatique en général.

En plus de discuter les conditions techniques, l'auteur s'occupe du synergisme entre chaleur et sulfamides, à la connaissance duquel il contribue avec données expérimentales.

### Zusammenfassung

Der Autor hat versucht, die Konzentrationen der Sulfanilamiden, des Sulfamidothiazol und der Dimethylbenzoylsulfonamiden (Irgafen), die notwendig sind festzustellen, um in 100 Prozent der Faelle und waehrend 24 Stunden die Entwicklung des *Staphylococcus Aureus* vollstaendig zu verhindern.

In keinem der Faelle war es moeglich, mit der Sulfanilamide eine Bakteriostasis der beschriebenen Art zu erzielen. Die notwendigen Konzentrationen fuer das Sulfamidothiazol und das Irgafen, beliefen sich auf 475 mgr. % respective 185 mgr. %.

In statistisch-grafischer Form stellt der Autor die Resultate dar, womit er Aktionskurven erzielt deren Bedeutung er insbesondere in Beziehung auf die Spezifitaet der Sulfamiden bespricht. In diesem Zusammenhang analysiert er die neuesten Errungenschaften der theoretischen Chemie. Ebenso bespricht er die Wertungsmethode der bacteriostatischen Konzentration im allgemeinen.

Ausser der Diskussion ueber die technischen Bedingungen, beschaeftigt sich der Autor des Sinergismus zwischen der Waerme und den Sulfamiden, zu deren Kenntniss er mit experimentalen Daten beitraegt.

### Bibliografia

1. BELL y ROBLIN. — J. Am. Chem. Soc., 64, 2905, 1942.
2. BELL, BONE y ROBLIN. — J. Am. Chem. Soc., 66, 867, 1944.
3. BLISS y DEITZ. — Bull. J. Hopkins Hosp., 75, 1, 1944.
4. BORDWELL y KLOTZ. — J. Am. Chem. Soc., 66, 660, 1944.
5. BRADBURY y JORDAN. — Biochem. J., 36, 287, 1942.
6. CAÑADELL. — Farmacoter. Actual, 2, 446, 1945.
7. EDWARDS y RETTGER. — J. Bact., 34, 489, 1937.
8. EVANS, FULLER y WALKER. — Lancet, 11º, 523, 1944.
9. GOETCHIUS y LAWRENCE. — J. Bact., 49, 575, 1945.
10. GREEN y BIELSCHOWSKY. — Brit. J. Exptl. Path., 23, 13, 1942.
11. HAMILTON y AMILTON. — Am. J. Clin. Path., 14, 502, 1944.
12. HARRIS y KOHN. — J. Pharmacol, 82, 1, 1944.
13. HIRSCH. — Science (N. Y.), 96, 139, 1942.
14. HIRSCH. — J. Immunol, 48, 199, 1944.
15. JOHNSON, GREEN y PAULI. — J. Biol. Chem., 153, 37, 1944.
16. KLOTZ y GUTMAN. — J. Am. Chem. Soc., 67, 558, 1945.
17. KUHN, MOELLER y WIENDT. — Ber. Chem. Ges, Frankfurt, 46, 405, 1943.
18. KUMLER y HALVERSTAD. — J. Am. Chem. Soc., 63, 2182, 1941.
19. KUMLER y DANIELS. — J. Am. Chem. Soc., 65, 2190, 1943.
20. KUMLER y STRAIT. — J. Am. Chem. Soc., 65, 1943.
21. LAEUGER y MARTIN. — Schweiz. Med. Woschschr., 73, 399, 1943.
22. LEE, EPSTEIN y FOLEY. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 53, 243, 1943.
23. LEE, EPSTEIN y FOLEY. — Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., 53, 245, 1943.
24. LIBBY. — J. Bact., 40, 733, 1940.
25. MARSHALL, LITCHFIELD, WHITE, BRATTON y SHEPHERD. — J. Pharmacol., 76, 226, 1942.
26. MARTIN y ROSE. — Biochem., J., 39, 91, 1945.
27. MUIR, SHAMLEFFER y JONES. — J. Bact., 44, 95, 1942.
28. PULVER y MARTIN. — Arch. Exptl. Path. Pharm., 201, 491, 1943.
29. PULVER y SUTER. — Schweiz. Med. Woschschr., 73, 403, 1943.
30. ROSE v FOX. — Science (N. Y.), 95, 412, 1942.
31. VAN DYKE, TUPIKOVA, CHOW y WALTEMR. — J. Pharmacol., 83, 203, 1945.
32. WHITE. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 43, 214, 1940.
33. WYSS, GRUBAUGH y SCHMELKES. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49, 618, 1942.