

ESTUDO COMPARATIVO DA AÇÃO TRIPANOSSOMICIDA "IN VITRO" DA VIOLETA DE GENCIANA E DO CRISTAL VIOLETA. PRIMEIROS ENSAIOS COM O EMPRÊGO DO VERDE DE METILA

Judith KLOETZEL (1)

RESUMO

A autora faz o estudo comparativo quanto ao espectro cromatográfico e quanto à atividade sobre o *Trypanosoma cruzi* dos corantes metil violeta, cristal violeta e violeta de genciana de diversas procedências, a fim de avaliar a possibilidade de seu emprêgo como profilático da moléstia de Chagas em bancos de sangue.

Conclui que:

1. Os cristais violeta apresentam-se à cromatografia com três frações azuladas distintas, enquanto que algumas violetas de genciana têm espectro semelhante a êste, outras ainda possuindo fração avermelhada.

2. O cristal violeta tem ação tripanossomicida idêntica à violeta de genciana de igual espectro cromatográfico; a violeta de genciana "avermelhada" é menos ativa.

3. Na profilaxia da moléstia de Chagas em bancos de sangue recomenda-se o emprêgo do cristal violeta (C.I. 681), numa concentração final de 1:4.000, a partir de uma solução a 0,5% em sôro glicosado, sendo o tempo de contato entre a droga e o sangue de no mínimo 24 horas à temperatura de geladeira.

4. O emprêgo do cristal violeta ao invés da violeta de genciana, apresenta a vantagem de uma composição constante, sendo que a tolerância de ambos os corantes é idêntica.

Foi investigado também o verde de metila, corante mais metilado que os outros membros da série, constatando-se acentuada ação tripanossomicida. Recomendam-se maiores investigações em tôrno desta droga.

INTRODUÇÃO

O problema da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue continua a merecer atenção, mormente em nosso meio, onde ainda é acentuada a incidência da infecção em doadores. Segundo o critério de seleção destes candidatos e sua procedência, esta incidência varia na cidade de São Paulo entre 1,0%³, 1,7-2,5%⁴ e 4,0%⁸. Outras investigações mostraram a incidência de 14,9% em São José do Rio Preto (São Paulo), 21,1% em Ribeirão Preto (São Paulo), 19,1% em Araguari (Minas Gerais)¹, 2,4%

em Belo Horizonte (Minas Gerais)⁹, 15% em Uberaba (Minas Gerais)⁵ e 3,6% em Recife (Pernambuco)¹⁰.

Em 1953, NUSSENZWEIG & col.⁷ demonstraram que a violeta de genciana em uma concentração final de 1:4.000 mata o *Trypanosoma cruzi* quando em contato com o parasito durante 24 horas em sangue armazenado em geladeira. Sendo a violeta de genciana uma mistura mal definida, composta de cloreto de hexa-, penta- e tetra-metil-pararo-

(1) Do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. Antônio Dácio Franco do Amaral).

sanilina², NUSSENZWEIG & col.^{6,7} experimentaram a ação de um metil violeta, composto principalmente por cloreto de tetra-metil-pararosanilina, bem como do cristal violeta, que é o cloreto de hexametil-pararosanilina puro. Verificaram que o metil violeta era bastante menos ativo que a violeta de genciana e o cristal violeta, apesar de resultados inicialmente encorajadores⁷, quando submetido a estudo mais minucioso, não esterilizou o sangue por completo na concentração de 1:4.000, sendo que 12,6% dos camundongos inoculados com sangue positivo submetido à ação do cristal violeta a 1:4.000 durante 24 horas, apresentaram parasitemia⁶.

Retomamos o estudo neste ponto, numa tentativa de verificar a composição da violeta de genciana originalmente empregada por NUSSENZWEIG & col.⁷, assim como de identificar a parte ativa da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Os corantes estudados foram colocados em tubo de ensaio, triturados no próprio tubo, suspensos em solução glicosada a 5% para a realização dos exames biológicos e em água destilada para as cromatografias, colocados em banho-maria a 100°C, filtrados, ampolados e autoclavados. Evitou-se desta forma a perda de corante que habitualmente ocorre com a trituração em almofariz. As soluções foram preparadas a 0,5% quando usadas para ensaios biológicos e a 1,0% para as cromatografias.

Na cromatografia ascendente, empregou-se papel Whatmann n.º 4 e como solvente o álcool etílico a 40%.

Nas experiências com sangue infectado foi empregada a cêpa Y de *Trypanosoma cruzi*, estudada por SILVA & NUSSENZWEIG¹¹, que se mostrou 100% infectante e mortal para 93,7% dos camundongos jovens.

O sangue era obtido por punção cardíaca de camundongos infectados, misturado à solução ACD na proporção de aproximadamente 70% de sangue e 30% de solução ACD, o que corresponde aos padrões habituais em banco de sangue. Utilizamos sempre camundongos altamente parasitados, isto é, apresentando aproximadamente 150 parasitos por 50 campos microscópicos (×320).

Nas experiências «in vitro» este sangue era colocado em contato com os corantes e observado a fresco, entre lâmina e lamínula, após tempos variáveis.

Para as experiências em animais, este sangue era misturado aos corantes, na proporção de 0,05 ml da solução a 0,5% do corante por centímetro cúbico de sangue infectado, correspondente a uma concentração final de 1:4.000. Este sangue era guardado 24 horas em geladeira, em seguida inoculado por via intraperitoneal em camundongos de 20-30 dias de idade, empregando-se 0,2 ml por animal. Os animais testemunhos eram inoculados com o sangue misturado à solução glicosada na mesma proporção e mantido em geladeira pelo mesmo espaço de tempo.

Inicialmente os animais eram examinados cada 3 dias, mais tarde cada 4-5 dias, durante 2 meses, por inspeção de gôta de sangue a fresco. Em seguida eram sacrificados e os cortes histológicos do coração examinados.

Foram empregados os seguintes corantes:

1. Violeta de genciana (Eli Lilly & Co., Indianapolis — Partida 5853-W89722).
2. Cristal violeta (Hartman-Leddon Co. — Total dye content 97% — C.I. 681).
3. Cristal violeta (E. Merck A.G.).
4. Violeta de genciana B (E. Merck A.G.).
5. Metil-violeta (Dr. G. Gruebler & Co.).
6. Cristal violeta DC 7 (Difco Lab., Detroit, Mich. — Actual dye content 96%).
7. Violeta de genciana (Dr. G. Gruebler & Co.).
8. Methyl green (G. T. Gurr, London).
9. Methylengrün (Dr. G. Gruebler & Co.).
10. Jodgrün (Dr. G. Gruebler & Co.).
11. Cristal violeta (Paul-Lewis Lab. Inc.).

RESULTADOS

1) Cromatografia.

Verificamos na cromatografia em papel que a migração decompõe os cristais violeta em três partes, de aspecto azulado; o metil

violeta avermelhado, apresenta Rf menor, ficando em parte no ponto de partida. No que diz respeito às violetas de genciana, algumas delas apresentam aspecto semelhante ao cristal violeta, enquanto outras contêm componente avermelhado, também com Rf baixo.

A cromatografia com a violeta de genciana de Eli Lilly & Co. tem aspecto semelhante à dos cristais violeta, enquanto que a violeta de genciana de Dr. G. Gruebler & Co. e a violeta de genciana B da E. Merck A.G. apresentam, além das frações azuis idênticas

ao cristal violeta, também uma fração mais avermelhada, com Rf menor.

Estas diferenças identificadas pela cromatografia encontram paralelo nos ensaios biológicos.

2) Ensaios "in vitro".

Misturando-se o sangue infectado dos camundongos com as soluções corantes e observando os parasitos após breve tempo de contato, os resultados obtidos são os representados no Quadro I.

QUADRO I

Ação de concentrações diversas dos corantes sôbre o *Trypanosoma cruzi*.

CORANTE USADO	Concentração	Tempo de contato * (minutos)	Resultado
<i>Metil Violeta</i>			
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 30	Muitos tripanosomas vivos, movimentos pouco alterados.
<i>Cristais violeta</i>			
Hartman-Leddon Co.	1:2.000	5	Todos mortos.
	1:3.000	5	Todos mortos.
	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
	1:6.000	Até 10	Raros vivos.
E. Merck A.G.	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
E. Merck (partida recente) ...	1:4.000	Até 5	Alguns vivos.
	1:4.000	Até 10	Todos mortos.
Difco Lab.	1:4.000	Até 10	Raros vivos.
	1:4.000	Até 15	Todos mortos.
Paul-Lewis Lab. Inc.	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 5	Alguns vivos, com movimentos alterados.
	1:4.000	Após 10,	Todos mortos.
<i>Violetas de genciana</i>			
I — "Avermelhadas"			
E. Merck A.G.-B	1:4.000	Até 30	Alguns vivos, com movimentos inalterados.
Dr. G. Gruebler & Co.	1:4.000	Até 15	Muitos vivos.
II — Com aspecto idêntico ao cristal violeta			
Eli Lilly & Co.	1:2.000	5	Todos mortos.
	1:3.000	5	Todos mortos.
	1:4.000	Até 15	Raros vivos.
	1:6.000	Após 15	Raros vivos.

* Alguns corantes não se dissolveram completamente em água. Nestes casos a concentração real foi determinada pela comparação fotométrica com solução alcoólica, utilizando-se fator de correção.

Por conseguinte foi possível verificar que todos os cristais violeta têm atividade semelhante, sendo perfeitamente comparáveis à violeta de genciana “azul”. As violetas de genciana “avermelhadas” têm ação tripanossomicida muito menos pronunciada.

Êstes achados também foram confirmados pelos ensaios “in vivo”.

3) Ensaios “in vivo”.

A inoculação em animais do sangue infectado deixado em contato com os corantes em geladeira durante 24 horas, revelou os resultados representados no Quadro II.

vidade menos pronunciada sôbre os tripanossomas que a violeta de genciana, composto hexametílico, tivemos a idéia de ensaiar ainda o corante denominado verde de metila, composto com mais um grupo metílico em sua molécula, sendo o cloreto de heptametilpararosanilina. O nome comercial “verde de metila” é empregado indiferentemente para o composto verde de metila e verde de etila²; como os fabricantes das drogas por nós ensaiadas não fornecem o “colour index” no rótulo, acreditamos que as discordâncias verificadas entre os resultados experimentais com os dois corantes devam-se à falta de uniformidade na nomenclatura comercial.

QUADRO II

Animais inoculados com sangue infectado e que ficou durante 24 horas na geladeira em contato com o corante.

CORANTE USADO	Concentração	Animais inoculados					
		Com o sangue tratado com o corante			Testemunhos		
		Nº	Nº de positivos	Nº de mortos	Nº	Nº de positivos	Nº de mortos
<i>Metil violeta</i>	1:4.000	12	12	12	6	6	6
<i>Violetas de genciana</i> “Avermelhadas”							
E. Merck A.G.-B	1:4.000	16	10	7	4	4	4
Dr. G. Gruebler & Co. ...	1:4.000	10	10	8	2	2	2
<i>Cristais violeta</i>							
Hartman-Leddon Co. ...	1:4.000	43	0	0	9	9	9
E. Merck A.G.	1:4.000	15	0	0	4	4	4
Difco Lab.	1:4.000	9	0	0	—	—	—

Os dados por nós apresentados realmente indicam que os cristais violeta têm atividade idêntica à da violeta de genciana da Eli Lilly & Co.⁶, enquanto que as outras violetas de genciana, avermelhadas, são menos ativas sôbre o *Trypanosoma cruzi*.

Uma vez que o metil violeta, isto é, o cloreto de tetrametilpararosanilina, tem ati-

Deliberamos também experimentar o corante Jodgruen, que é o cloreto de octa-metilpararosanilina.

Os resultados por nós obtidos são os expostos no Quadro III.

Êstes dados nos animaram a efetuar ensaios “in vivo” com o corante Methylgreen (Quadro IV).

KLOETZEL, J. — Estudo comparativo da ação tripanossomicida «in vitro» da violeta de genciana e do cristal violeta: primeiros ensaios com o emprego do verde de metila. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:254-260, 1961.

QUADRO III

Ação de concentrações diversas do verde de metila e do Jodgruen sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro".

CORANTE USADO	Concentração	Tempo de contato (minutos)	Resultado
Jodgruen			
(Dr. G. Gruebler & Co.)	1:4.000	15	Todos vivos.
Methylengruen			
(Dr. G. Gruebler & Co.)	1:4.000	15	Todos vivos.
Methyl green			
(G. T. Gurr)	1:4.000	5	Alguns mortos.
	1:4.000	10	Raros vivos.
	1:4.000	15	Todos mortos.
	1:6.000	10	Alguns vivos, com movimento alterado.
	1:6.000	40	Raros vivos, com movimento alterado.
	1:8.000	30	Raros vivos, com movimento alterado.
	1:8.000	50	Raros vivos, quase imóveis.

QUADRO IV

Animais inoculados com sangue infectado e que ficou durante 24 horas na geladeira em contato com o corante Methylgreen (G. T. Gurr, London).

Concentração	Nº de animais inoculados	Nº de animais positivos
1:4.000	12	0
1:6.000	6	0
Testemunhos	4	4

O tempo de sobrevivência máximo dos animais testemunhos foi de 20 dias.

Verificamos assim que o Methylengrün e o Jodgrün em concentração de 1:4.000 não têm atividade sobre os tripanosomas após tempo de contato de 15 minutos, enquanto que o Methylgreen da G. T. Gurr, a uma concentração de 1:4.000 mata todos os parasitos em 15 minutos, ainda tendo acentua-

da ação tripanossomicida a 1:8.000. Doze camundongos inoculados com o sangue infectado mantido em contato com a droga em geladeira durante 24 horas e 6 camundongos inoculados nas mesmas condições com a droga a 1:6.000, não contraíram a doença.

Os animais negativos nas experiências discriminadas no Quadro II foram sacrificados com 2 meses, os cortes histológicos do miocárdio confirmando a negatividade. Os animais submetidos ao ensaio preliminar com Methylgreen foram sacrificados após período idêntico, porém não foram feitos cortes histológicos.

Tentamos reproduzir o espectro cromatográfico da violeta de genciana "avermelhada" misturando o cristal violeta com o metil violeta em proporções diversas. Porém mesmo usando uma mistura de 70% de solução de metil violeta e 30% de solução de cristal violeta, o aspecto cromatográfico apresenta-se com a fração de RF maior (portanto correspondente ao cristal violeta) bastante mais

pronunciada que a da violeta de genciana vermelha, e a fração de Rf mais baixo, correspondente à fração vermelha, muito menos pronunciada que a obtida com a violeta de genciana vermelha.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A série de experiências feitas permite, a nosso ver, a conclusão de que o cristal violeta pode substituir com vantagem a violeta de genciana na profilaxia da doença de Chagas em banco de sangue. Enquanto a violeta de genciana é corante de composição variável de fabricante para fabricante, algumas amostras tendo ação tripanossomicida total e outras não conseguindo esterilizar o sangue, o cristal violeta é composto bem definido.

Acreditamos que a discordância entre os nossos resultados e aqueles de NUSSENZWEIG & col.^{6,7} que não conseguiram esterilização completa do sangue com o cristal violeta de Hartman-Leddon Co., em uma concentração de 1:4.000, se deva ao método de solubilização do corante. Tivemos o hábito de sempre triturar o corante no próprio tubo, evitando assim a perda que é habitual na trituração em almofariz.

É interessante salientar a atividade tripanossomicida do verde de metila. Uma vez que o metil violeta, do grupo aquele que menos radicais metílicos possui e de menor peso molecular, é o menos ativo do grupo, achamos útil prosseguir as investigações em torno da atividade do verde de metila, um dos mais metilados da série. Um estudo comparativo e de sentido mais amplo do que este nosso primeiro ensaio, mostrará se realmente a atividade contra o *Trypanosoma cruzi* corre paralelamente ao número de radicais metílicos presentes na molécula do corante.

Em conclusão, recomendamos que os bancos de sangue passem a empregar o cristal violeta C.I. 681, corante de fórmula conhecida e composição constante, em lugar da violeta de genciana, que varia de fabricante a fabricante, de lote para lote. Empregar-se-á o cristal violeta a partir de uma solução

a 0,5% em sôro glicosado, numa concentração final de 1:4.000.

Não há restrições quanto ao emprego do cristal violeta nesta concentração, igual à anteriormente preconizada para a violeta de genciana, pois que quando os autores se referem à "violeta de genciana", muitas vezes na realidade trabalham com o cristal violeta, já que os termos muitas vezes são empregados como sinônimos. Tem-se certeza apenas da composição exata do cristal violeta quando este leva o número C.I. 681, codificado.

SUMMARY

Comparative study of trypanocidal activity of gentian violet and crystal violet "in vitro". First trials with methyl green.

Since 1953 the usefulness of gentian violet in the prophylaxis of Chagas disease has been well-known and blood banks in Brazil have been employing this stain in a final concentration of 1:4000 in blood stored at a low temperature for at least 24 hours.

In the present paper the author makes a comparison between gentian violet and the stains crystal violet and methyl violet as to biological activity against *Trypanosoma cruzi* and as to their chromatographic spectra.

The following conclusions were reached:

1. Crystal violet presents three "blue" fractions on chromatography. Gentian violet varies in composition, some batches exhibiting spectra similar to crystal violet while others also contain a "reddish" fraction.

2. The biological activity of crystal violet and "blue" gentian violet is identical; the "reddish" gentian violet, however, is less active.

3. Since crystal violet is a definite compound, without the variability in composition shown by commercial gentian violet, the use of the former stain in the prophylaxis of Chagas disease in blood banks is to be recommended.

The stain should be used in a final concentration of 1:4000, starting from 0.5%

solutions in glyucose, and the blood stored in the refrigerator for at least 24 hours.

The author has also investigated the stain called methyl green, the most methylated of this series of stains. Biological tests have shown that methyl green exhibits a high order of activity against *Trypanosoma cruzi* and further work along these lines is called for.

REFERÊNCIAS

1. BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P. de; AMATO Neto, V.; NUSSEZWEIG, V. & SONNTAG, R. — Investigações sorológicas sobre doença de Chagas entre candidatos a doadores em bancos de sangue nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Hospital, Rio de Janeiro 44:745-749, 1953.
2. CONN, H. J. — Biological stains. 5th ed. Geneva (N.Y.), Biotech. publications, 1946.
3. FARIA, R.; MELLO, N. R. & MURAT, L. G. — Contribuição para o estudo médico e social do doador de sangue. Folia clin. & biol. 16:158-163, 1950.
4. FREITAS, J. L. P. de; BIANCALANA, A.; AMATO Neto, V.; NUSSEZWEIG, V.; SONNTAG, R. & BARRETTO, J. G. — Moléstia de Chagas em bancos de sangue na Capital de São Paulo. Hospital, Rio de Janeiro 42: 229-236, 1952.
5. JANTENE, A. D. & JACOMO, R. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. Rev. goiana Med. 5:23-30, 1959.
6. NUSSENZWEIG, V.; AMATO Neto, V.; FREITAS, J. L. P. de; NUSSENZWEIG, R. S. & BIANCALANA, A. — Moléstia de Chagas em bancos de sangue. Rev. Hosp. Clín. 10:265-283, 1955.
7. NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P. de; AMATO Neto, V. & KLOETZEL, J. — Ação de corantes tri-fenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro": emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. Hospital, Rio de Janeiro 44:731-744, 1953.
8. PASSALACQUA, C. de S. P.; AMATO Neto, V.; ZATZ, I. & DAMASCO, A. — Incidência da doença de Chagas entre os candidatos a doadores de um banco de sangue de São Paulo: inquérito sorológico. Hospital, Rio de Janeiro 43:443-447, 1953.
9. PELLEGRINO, J.; BOROTCHIN, M.; LEITE, G. & BRENER, Z. — Inquérito sobre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 49:555-564, 1951.
10. SILVA, L. H. P. da & LIMA, D. — Pesquisa de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* entre candidatos a doadores em banco de sangue do Recife, Pernambuco. Publ. méd. 27 (195):23-25, 1956.

Recebido para publicação em 23 agosto 1961.