

Para usar, dilue-se um volume deste soluto stock com quatro de água destilada, obtendo-se assim a solução isotónica de cloreto de sódio tamponada empregue como diluente de todos os reagentes.

A solução stock deve guardar-se no frigorífico e apenas diluir-se a quantidade conveniente para uso diário.

O diluente tamponado com fosfatos usado por alguns laboratórios apresenta o inconveniente da insolubilidade do fosfato de cálcio.

### GLÓBULOS DE CARNEIRO

O sangue do animal, colhido assépticamente (a preservação dos eritrócitos em condições de assepsia é de notória importância, principalmente na titulação do amboceptor, pois antigénios microbianos produzidos no sangue podem ser adsorvidos pelas células) mistura-se em partes iguais com soluto de Alsever modificado (BUKANTZ, REIN e KENT, 1946) e conserva-se a 2-5°. A composição deste soluto é a seguinte:

Glucose . . . . .	2,05 g
Citrato de sódio, 6OH <sub>2</sub> . . . . .	0,80 g
Cloreto de sódio . . . . .	0,42 g
Água dest. q. b. . . . .	100 ml

Ajusta-se o pH a 6,1 com ácido cítrico a 10% e esteriliza-se uma hora a vapor fluente.

É também conveniente deixar «envelhecer» o sangue colhido desta forma durante uma semana antes de o usar, a fim de estabilizar a susceptibilidade dos eritrócitos à acção lítica da hemolisina e complemento.

Retira-se assépticamente a quantidade de sangue necessária para uso diário, lavam-se as células três vezes da maneira usual e faz-se uma suspensão preliminar juntando a um volume quarenta volumes do diluente. Esta diluição tem, intencionalmente, maior concentração que a usada na prova para evitar, quando da sua standardização, a necessidade de remover diluente, tarefa mais trabalhosa que a sua simples adição até à concentração desejada.

A standardização leva-se a cabo do seguinte modo: dilue-se 1 ml da suspensão preliminar com 9 volumes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,01% e a densidade óptica do lisado lê-se no espectrofotómetro usando o soluto de carbonato como blank e no comprimento de onda de 545 m $\mu$ .

A quantidade de diluente a juntar à suspensão preliminar é dada pela fórmula:

$$V = \frac{Do_1 - Do_2}{Do_2} \cdot v$$

em que V representa o volume de diluente a adicionar, Do<sub>1</sub> a densidade óptica medida, Do<sub>2</sub> a densidade óptica da suspensão standardizada e v o volume da suspensão a ajustar.

A densidade óptica da suspensão standardizada (Do<sub>2</sub>) foi previamente determinada e corresponde à concentração hemoglobínica de 1 ml, lisado nas condições expostas, numa suspensão de eritrócitos contendo 5×10<sup>8</sup> células/ml.

Cada laboratório, consoante o espectrofotómetro que possuir e os tubos ou cuvetes que usar, deverá determinar a densidade óptica do lisado correspondente a este número de células.

Depois de standardizada a suspensão guarda-se no frigorífico, em recipiente rolhado, até ser usada.

## HEMOLISINA

Muitos são os métodos propostos para a imunização dos coelhos destinados à produção de amboceptor, sendo a sua escolha mais objecto da preferência do analista do que dependente dos resultados práticos obtidos.

Contudo, estudos sobre a cinética da hemólise pelo amboceptor e complemento mostram diferenças no comportamento de vários antisoros.

Vejam, muito resumidamente, o que se passa nessas experiências cinéticas.

Podemos considerar dois sistemas hemolíticos: um (*sistema de complemento limitado*) em que, como na titulação do complemento, este se faz reagir com glóbulos «óptimamente sensibilizados» (o significado desta expressão será discutido adiante); outro em que a reacção se processa entre uma quantidade relativamente baixa de hemolisina e um excesso de complemento (*sistema de anticorpo limitado*).

Se, a intervalos regulares, tirarmos amostras cujos graus de hemólise se lêem espectrofotometricamente e com esses valores construirmos um gráfico, verifica-se que, no caso do sistema de complemento limitado, se obtém uma curva sigmoide e que a velocidade de lise parte de zero para atingir um máximo dependente da quantidade de complemento e logo declina para atingir o zero, de novo, ao fim de cerca de 90 minutos (a 37°).

Tratando-se, porém, do sistema de anticorpo limitado, mesmo com várias horas de incubação não conseguimos um ponto final na hemólise.

Além disso as curvas obtidas diferem conforme o modo de preparação do antigénio usado na imunização dos coelhos. Com um antisoro produzido injectando glóbulos de carneiro lavados e outro em que são usados os estromas fervidos, verificar-se-á, numa incubação de 30 minutos, que o segundo apresenta um título mais alto, enquanto que o primeiro se revelará de mais elevada potência se a incubação se prolongar por duas horas.

Crê-se que estes diferentes comportamentos têm a sua razão de ser na dissociação das moléculas do anticorpo do complexo glóbulo-anticorpo (segundo a hipótese de WEINRACH e TALMAGE são necessárias duas moléculas de anticorpo para sensibilizar um ponto na superfície da célula). Estas moléculas tornar-se-ão a associar, quer na mesma quer em diferente célula e, pela repetição deste fenómeno, uma mesma molécula estará em constante transferência de célula para célula ou de sítio para sítio no mesmo glóbulo, exercendo a sua acção enquanto houver células e excesso de complemento.

Nem todos os amboceptores apresentam este poder de transferência. Pessoalmente, na preparação de hemolisina, usamos o método de DARRER (1953) cujo esquema, acrescido por DE BRUIJN com duas injeções intravenosas, é o seguinte:

DIA	1	0,5 ml	} sangue de carneiro em solução de Alsever in- jectado intracutânea- mente.
»	3	1,0 ml	
»	5	1,5 ml	
»	7	2,0 ml	
»	9	2,5 ml	
»	12		} suspensão a 20 % de glóbulos lavados, in- jectados endovenosa- mente.
»	15	1,0	
»	18	1,0	
»	21	1,0	
»	23	1,0	
»	25	SANGRIA DO ANIMAL	

O soro obtido inactiva-se a 56° durante 30 minutos e preserva-se com mertiolato na concentração final de 1/10 000.

Para usar, partimos duma diluição a 1/100, de duração indefinida quando conservada a — 20°.

A dose de hemolisina a empregar na reacção de Wassermann é determinada pela chamada titulação da hemolisina.

Na reacção clássica de Kolmer esta titulação é feita juntando a concentrações decrescentes de amboceptor a mesma quantidade de células de carneiro e um excesso de complemento.

Após incubação de 60 minutos a 37°, a concentração de hemolisina correspondente ao último tubo que apresenta hemólise total chama-se «dose hemolítica mínima».

Kolmer usa na sua prova de fixação de complemento 2 doses hemolíticas mínimas por, empiricamente, ter verificado que assim obtinha os melhores resultados.

As quantidades de hemolisina e complemento estão relacionadas em ordem inversa, isto é, em presença de maior dose da primeira é geralmente menor a quantidade de complemento suficiente para obter o mesmo grau de hemólise. Isto é verdadeiro até uma determinada concentração que é chamada «concentração óptima do amboceptor».

Além desta dose, pequenos aumentos não são capazes de exercer apreciável influência sobre a actividade hemolítica do complemento, isto é, a quantidade deste necessária para lisar 50 % das células mantém-se sensivelmente a mesma.

Pretende-se medir a actividade lítica do complemento, sem que as hemolisinas naturais anticarneiro presentes nos soros humano ou de coelho possam influir, em grau sensível, nessa actividade; atinge-se esse fim com o emprego das células «óptimamente sensibilizadas».

Descrevemos em seguida a técnica de KENT (1946) para determinar a dose óptima de hemolisina, adaptando-a à técnica do test de fixação que exporemos na última parte deste trabalho.

O complemento é titulado achando-se a quantidade capaz de lisar 50 % das células presentes, quantidade que se denomina «unidade 50 %» e se simboliza por C'H<sub>50</sub>.

As doses de reagentes medem-se rigorosamente e devem ser adicionadas pela ordem apresentada no quadro seguinte (DE BRULIN):

Tubos . . . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluyente, ml . . . . .	2,0	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,5	1,5	1,5
Complemento 1/50, ml . . . . .	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5
Idem, 1/250, ml . . . . .	—	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	—	—	—
Glóbulos sensibilizados . . . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

O diluyente e o complemento misturam-se cuidadosamente antes da adição dos glóbulos sensibilizados.

A sensibilização leva-se a cabo juntando partes iguais da suspensão de células standardizadas e de hemolisina 1/500 (obtida como na técnica de Kolmer a partir do soluto stock 1/100 diluído com quatro volumes do diluyente). A ordem de adição não é arbitrária: a diluição da hemolisina junta-se gota a gota à suspensão celular, agitando constantemente. A mistura repousa 10 minutos à temperatura ambiente.

Rolham-se os tubos e incubam-se 30 minutos a 37°, agitando, por inversão, uma vez aos 15 minutos.

Após o período de incubação centrifugam-se 10 minutos a 2000 r/m. Separam-se os sobrenadantes cujas densidades ópticas se lêem a 545 m $\mu$ , usando o tubo 1 como referência O. A densidade óptica média dos tubos 7,8 e 9 (que contêm um excesso de complemento visando obter hemólise completa) servir-nos-á para calcular as percentagens das hemólises parciais obtidas nos tubos 2 a 6. Estas percentagens calculam-se dividindo a densidade óptica do respectivo sobrenadante multiplicada por 100, pela densidade óptica média correspondente à hemólise 100 %. As percentagens das hemólises parciais, de preferência as compreendidas entre

os 20 e os 70 %, marcam-se em abscissas, usando papel probit-logarítmico, e em ordenadas as respectivas quantidades de complemento diluído 1/250.

A unidade 50 % ( $C'H_{50}$ ) lê-se no gráfico obtido e calcula-se em seguida a diluição a efectuar de forma a que esta unidade esteja contida em 0,5 ml, que é o volume a usar na determinação da dose óptima de amboceptor.

Se chamarmos  $x$  à quantidade de complemento 1/250 necessária para obter  $C'H_{50}$ ,  $y$ , que é a diluição do complemento stock 1/50 que contém a unidade em 0,5 ml, determina-se por meio das relações:

$$a) \frac{y'}{250} = \frac{0,5}{x} \quad \text{e} \quad b) \quad y = \frac{y'}{50}$$

em que  $y'$  é a diluição a que deve submeter-se o complemento puro de forma a conter 1 unidade em 0,5 ml.

Resolvendo a equação a) em ordem a  $y'$ , teremos:

$$y' = \frac{125}{x}$$

Substituindo em b) e simplificando, obtemos:

$$y = \frac{125}{x} \cdot \frac{2,5}{50} = \frac{2,5}{x}$$

fórmula que nos permite calcular a diluição do complemento stock que contém  $C'H_{50}$  em 0,5 ml, como pretendíamos. Apresentamos um exemplo prático:

Supunhamos que  $C'H_{50}$  é igual a 0,58 ml de complemento 1/250. Pretendemos determinar  $y$ :

$$y = \frac{2,5}{0,58} = 4,3$$

## Centro de Documentação Farmacêutica

Isto é, se a 1,0 ml de complemento stock 1/50 juntarmos 3,3 ml de diluente obteremos 4,3 ml duma diluição de complemento que contém  $C'H_{50}$  em 0,5 ml, como era nossa intenção. Calculada a diluição de complemento contendo a unidade, procedemos seguidamente a calcular a concentração óptima de hemolisina.

Para tal, combinamos quantidades de amboceptor 1/500 (rigorosamente medidas) como diluente de forma a obter uma série de diluições espaçadas pelo factor 1,2 ou 1,5 (De 1/500 a 1/4000, por exemplo).

Em tubos separados medimos iguais volumes de células standardizadas que se sensibilizam, segundo a técnica já anteriormente descrita, com as diversas diluições do amboceptor.

Numa série de tubos de hemólise, tantos quantos as diluições preparadas, medimos 0,5 ml do complemento diluído contendo a unidade 50 %; junta-se seguidamente 1,5 ml do diluente, mistura-se e adiciona-se 1,0 ml das células sensibilizadas com várias concentrações do amboceptor.

Segue-se um período de incubação de 30 minutos a 37°, findo o qual todos os tubos se centrifugam 10 minutos a 2000 r/m. Separam-se os sobrenadantes e lêem-se as respectivas densidades ópticas usando o tubo 1 da titulação do complemento como referência 0 e o valor médio (já achado) das densidades ópticas dos tubos 7 a 9 como estandarde de referência para a hemólise 100 %.

Procedemos como na titulação do complemento para a determinação das hemólises parciais correspondentes a cada diluição do amboceptor.

Observando essas hemólises parciais notaremos que, a partir duma determinada diluição, os seus valores mantêm-se sensivelmente constantes.

Essa diluição além da qual um aumento da dose de hemolisina não é capaz de ter apreciável acção sobre o grau de hemólise, é tomada como correspondendo à «concentração óptima».

Quando se determinou correctamente a unidade 50 %, o tubo que contém a diluição 1/500 da hemolisina deve apresentar uma hemólise de 50 %. (Aceitam-se variações de  $\pm 10\%$ ).

A concentração óptima só necessita ser de novo determinada quando se suspeite alteração do amboceptor. Contudo, aconselhamos a sua verificação uma ou duas vezes por ano.

Se em ordenadas tomarmos o número de unidades de complemento que foram necessárias para cada hemólise parcial (este número é dado por tabelas que relacionam a hemólise observada com uma unidade de complemento com as unidades necessárias para 50 % de hemólise) e em abscissas as concentrações de amboceptor, obteremos uma curva deste tipo (fig. 1.):

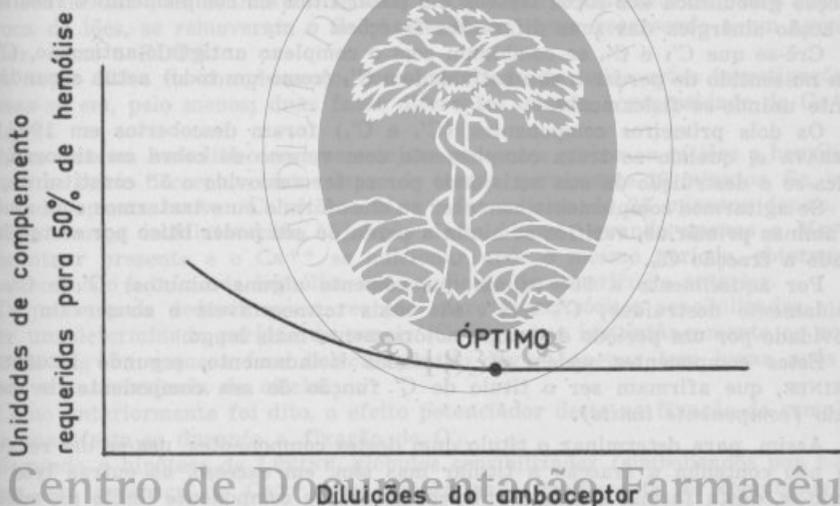


FIG. 1

Da sua análise conclui-se que a «concentração óptima» será a menor diluição compreendida na porção aparentemente linear do gráfico traçado.

Na prática, como vimos, não há necessidade de recorrer ao método gráfico, aqui sucintamente exposto; a simples observação das percentagens das hemólises parciais diz-nos claramente qual a diluição representativa da concentração ou dose óptima.

#### COMPLEMENTO

BUCHNER em 1889, em seus estudos sobre imunidade, designou por *alexina*, que etimologicamente significa «substância de defesa», o elemento existente no sangue e noutros líquidos orgânicos de animais normais ou imunizados e cuja luta contra os micróbios patogênicos se traduzia, como comprovou, pelo facto do soro sanguíneo, livre de leucócitos, ser capaz de destruir certas bactérias patogênicas.

Mais tarde, a este elemento portador do citado efeito bacteriolítico, chamou EHRlich *complemento* por admitir que o seu papel era o de completar a actividade do anticorpo sobre o antígeno homólogo.

Este investigador demonstrou que o efeito destruidor do complemento se manifestava unicamente quando o antígeno se encontrava saturado com o anticorpo homólogo e admitia existirem dois grupos hipotéticos na molécula do complemento: *haptóforo*, aquele que se punha em contacto directo com o anticorpo específico que se fixava ao antígeno e *ergóforo*, ao qual cabia a responsabilidade do efeito lítico sobre o antígeno.

EHRlich e os investigadores da sua escola criam também que havia duas espécies de complemento num mesmo soro, quer dizer, um que intervinha nas reacções hemolíticas e outro nas bacteriolíticas.

Hoje os nossos conhecimentos sobre o complemento e o seu efeito lítico são, por certo, bem diferentes do que o eram há 60 anos, ainda que nem todos os aspectos concernentes à sua natureza e modo de acção estejam suficientemente esclarecidos.

Reconhecem-se actualmente, pelo menos, 5 componentes no complemento ( $C'$ ) que se designam por  $C'_1$ ,  $C'_2$ ,  $C'_3$ ,  $C'_4$  e  $C'_5$ . Estes componentes estão contidos na fracção globulínica dos soros frescos e o poder lítico do complemento é resultante da acção sinérgica das suas diferentes fracções.

Crê-se que  $C'_1$  e  $C'_4$  se combinam com o complexo antígeno-anticorpo,  $C'_2$  se fixa no sentido de perder a sua actividade e  $C'_5$  (como um todo) actua secundariamente unindo-se fisicamente.

Os dois primeiros componentes ( $C'_1$  e  $C'_2$ ) foram descobertos em 1907 por FERRATA e, quando se trata complemento com veneno de cobra ou zimosan, verifica-se a destruição da sua actividade por se ter removido o 3.º constituinte,  $C'_3$ .

Se agitarmos complemento com eter ou clorofórmio ou o tratarmos com amónia ou aminas primárias, verifica-se ainda a perda do seu poder lítico por se ter inactivado a fracção  $C'_4$ .

Por aquecimento a  $56^\circ$  (ainda que somente alguns minutos)  $C'_1$  e  $C'_2$  são rapidamente destruídos;  $C'_3$  e  $C'_4$  são mais termoestáveis e conservam a sua actividade por um período de tempo notoriamente mais longo.

Estes componentes podem ser titulados isoladamente, segundo HEGEDUS e GREINER, que afirmam ser o título de  $C'$  função do seu componente de menor título (*componente limite*).

Assim, para determinar o título dum destes componentes, usa-se um reagente que não contenha a fracção a titular mas sim, em excesso, as outras três tornando-se, desta forma, o componente em questão o componente limite na mistura reagente-desconhecido. Os reagentes para titular  $C'_1$ ,  $C'_2$ ,  $C'_3$  e  $C'_4$  são designados por  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$ . Os resultados fornecidos por este método estão sujeitos a um determinado grau de incerteza. Novos métodos, baseados em modernos conceitos e técnicas estão em estudo, mas, por enquanto, terá o imunologista de continuar usando o procedimento de HEGEDUS e GREINER. Igualmente o conceito destes autores sobre o título do complemento fazendo-o depender do componente limite, carece de base à luz dos actuais conhecimentos.

Interpreta-se hoje esse título como resultante da acção de  $C'_3$  sobre  $EAC'_{1+2}$  e da degradação deste produto intermédio. Em presença duma alta concentração de  $C'_3$ , a degradação é, até certo ponto, contrariada porque muitos  $SA_2C'_{1+2}$  poderão atingir o estado  $S^*$ ; por outro lado, se houver bastante  $C'_2$  igualmente a degradação não terá grande influência devido à constante recomposição de  $EAC'_{1+2}$ . Como no soro de cobaio, tanto  $C'_2$  como  $C'_3$  não se encontram em quantidades capazes de se atingir qualquer das situações descritas, infere-se que, pequenas alterações na concentração de uma ou outra destas fracções, se reflectirão no seu título.

Quanto a  $C'_1$  e  $C'_4$  o problema é um tanto ainda obscuro mas sabe-se que, usando altas doses de hemolisina para sensibilização, a quantidade de  $SA_2C'_{1+4}$

formados, depende das concentrações de  $C'_1$  e  $C'_4$ . Na titulação usual de complemento em que a hemolisina se emprega na «dose óptima», esta expressão significa que o amboceptor se encontra apenas em ligeiro excesso sobre as concentrações de  $C'_1$  e  $C'_4$  e, conseqüentemente, estes componentes terão, sobre o título do complemento, uma influência menos marcada que a de  $C'_2$  e  $C'_3$ .

(O significado dos símbolos usados nos parágrafos anteriores será devidamente esclarecido nas páginas seguintes).

PILLEMER, BIER, TRAPP e outros, usando nas suas experiências os reagentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$ , deduziram a ordem por que actuam os componentes do complemento, estabelecendo a seqüência:  $C'_{1,4,2,3}$  ou  $C'_{4,1,2,3}$ .

Mais modernamente LEVINE (1951) e outros, estudando o papel do  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  e a cinética do processo hemolítico estabeleceram em definitivo a natureza da actuação dos diferentes componentes e as propriedades dos respectivos produtos intermédios.

O papel do  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  na fixação do complemento verificou-se recorrendo à reacção de fixação quantitativa na qual se faz uso dum excesso de complemento (100 ou mais  $C'H_{50}$ ). Por titulação rigorosa das unidades residuais, determina-se o número das que foram fixadas. As funções próprias de cada um dos catiões foram conhecidas quer usando um sistema em que, por tratamento com uma resina de troca de iões, se removeram o  $Ca^{++}$  e o  $Mg^{++}$ , quer recorrendo a um agente inibidor, como o EDTA.

A acção lítica do complemento, como resultado de todas estas investigações, processa-se em, pelo menos, duas fases diferentes quanto à necessidade de  $Ca^{++}$  ou  $Mg^{++}$ .

Num sistema hemolítico em que estejam presentes ambos os catiões a hemólise somente se inicia decorrido certos lapso de tempo, geralmente 10 minutos. Se, por outro lado apenas houver  $Ca^{++}$  e o  $Mg^{++}$  for adicionado 23 minutos depois, a hemólise começa imediatamente à junção deste último; quando apenas o  $Mg^{++}$  se encontrar presente e o  $Ca^{++}$  se adicionar após o mesmo período, obteremos do mesmo modo o início da hemólise nas condições da experiência anterior.

Daqui se pode deduzir que a reacção entre os eritrócitos sensibilizados e  $C'$  requer um determinado período de tempo ( $Ca^{++}$  actua instantaneamente ao contrário do  $Mg^{++}$ ) e que a fase de actuação do  $Mg^{++}$  apenas tem lugar após a respectiva interferência do cálcio.

Como anteriormente foi dito, o efeito potenciador deste na fixação do complemento manifesta-se durante a fixação de  $C'_1$ .

Segundo a hipótese de LEVINE, glóbulos sensibilizados (simbolizados por EA) reagem, em presença do  $Ca^{++}$ , com determinado componente do complemento,  $C'_x$ , formando um complexo  $EAC'_x$ . Se adicionarmos  $Mg^{++}$ , este complexo reagirá com outros componentes,  $C'_y$ , resultando  $EAC'_x C'_y$ .

Empregando os clássicos reagentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  verificou-se que  $C'_x$  compreende  $C'_1$  e  $C'_4$  e  $C'_y$ ,  $C'_2$  e  $C'_3$ .

Resumindo, quando um eritrócito sensibilizado, EA, sofre a acção do complemento, reage primeiramente (na presença de  $Ca^{++}$ ), com  $C'_1$ , do que resulta a formação dum complexo intermédio,  $EAC'_1$ . Este complexo reagirá em seguida com  $C'_4$  para dar  $EAC'_{1,4}$  que, por sua vez havendo  $Mg^{++}$  em concentração adequada, se combina com  $C'_2$  para se tornar em  $EAC'_{1,4,2}$ , o qual se liga a  $C'_3$  e dá  $EAC'_{1,4,2,3}$ .

Este eritrócito  $EAC'_{1,4,2,3}$ , que se simboliza por  $E^*$ , lisa-se espontaneamente dependendo a velocidade da lise da temperatura e da quantidade de  $C'$  presente.

Uma célula no estado  $E^*$  perde rapidamente o seu potássio intracelular, amino ácidos e ribonucleótidos através duma lesão  $S^*$  produzida na sua membrana, tornando-se permeável ao sódio existente no meio.

Isto provoca alterações osmóticas que conduzem à destruição da célula (cf. com o que se passa quando células de certos tumores se põem em contacto com anti-corpo e complemento).

Quando um eritrócito sensibilizado atinge o grau  $EAC'_{1,4,2}$ , este produto tende a degradar-se antes de combinar-se com  $C'_3$ .

Se chamarmos S ao ponto da superfície do eritrócito onde se dão as combinações durante o processo imuno-hemolítico e  $SA_2$  a um desses pontos já sensibilizados, este, quando  $SA_2C'_{1,4}$  reagirá com  $C'_2$  para formar  $SA_2C'_{1,4,2}$ . Como já dissemos,  $SA_2C'_{1,4,2}$  é instável e tem tendência a regressar a  $SA_2C'_{1,4}$ .

Como a acção de  $C'_3$  é relativamente lenta, a instabilidade de  $SA_2C'_{1,4,2}$  limita o número de  $S^*$  formados por somente parte de  $SA_2C'_{1,4}$  poderem ser convertidos em  $S^*$ , dependendo este número da quantidade presente de  $C'_2$  e da concentração de  $C'_3$ .

Se não houver altas concentrações de nenhum destes componentes, que é o caso usual na titulação do complemento, somente uma baixa percentagem (1-2 %) de  $SA_2C'_{1,4}$  vêm a tornar-se  $S^*$ .

A degradação de  $EAC'_{1,4,2}$  é importante na titulação do complemento. Como anteriormente foi dito, o componente  $C'_3$  actua lentamente e como  $C'_2$  é fixado com rapidez, há um acúmulo de células no estado intermédio  $EAC'_{1,4,2}$ , embora em constante degradação. Por esta razão a reacção com  $C'_3$  faz-se em termos de competição entre a sua fixação e a instabilidade de  $EAC'_{1,4,2}$ .

Como veremos, o volume em que os reagentes actuam durante a titulação do complemento é um dos factores que influenciam o grau de lise, que é inversamente proporcional a esse volume.

Esta influência põe-se de manifesto se atentarmos em que a degradação é independente da concentração dos reagentes, enquanto que a fixação de  $C'_3$  aumenta se aumentarmos a sua concentração; daqui, a formação de maior número de  $E^*$  e, conseqüentemente, de células lisadas, é mais elevada se houver maior concentração de reagentes.

A actividade hemolítica do complemento pode medir-se pela menor quantidade de soro fresco que é capaz de lisar completamente uma determinada porção de eritrócitos sensibilizados. É preferível, porém, usar como unidade dessa actividade a dose daquele com a qual se logra obter 50 % de lise das células existentes no sistema.

A relação entre determinadas quantidades de complemento e os respectivos graus de hemólise produzidos não é linear, mas toma o aspecto duma curva sigmoidal (Fig. 2).

Pela análise desta curva podemos verificar que o ponto em que se atinge a lise do número total das células presentes é difícil de avaliar, sendo preciso usar doses relativamente mais altas de complemento para que os últimos 5-10 % de eritrócitos possam ser destruídos. Inversamente, na região central, a inclinação da curva acentua-se abruptamente, o que é indice de sensibilidade a pequenas variações na dose de complemento.

Dada a necessidade duma rigorosa titulação deste, é pois desaconselhável o uso da unidade 100 % de hemólise, como reflexo da sua actividade lítica.

A unidade 50 % é uma unidade arbitraria, pois o seu valor é dependente do número de células, da sua fragilidade, da dose de amboceptor, da força iónica do sistema em que se processa a reacção, pH, concentrações de  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ , tempo e temperatura de incubação e volume final.

Para uma boa reprodutibilidade devem controlar-se cuidadosamente todos estes factores.

No método que apresentamos para titulação de complemento,  $C'H_{50}$  será defenida como «o volume em mililitros capaz de lisar  $1,25 \times 10^8$  células optimummente sensibilizadas num sistema hemolítico contendo  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  nas concentrações ideais e no volume total de 3 ml após 30 minutos de incubação a  $37 \pm 0,2^\circ$ ».

A propósito da titulação da hemolisina já nos referimos à relação existente entre a sua quantidade e a do complemento.

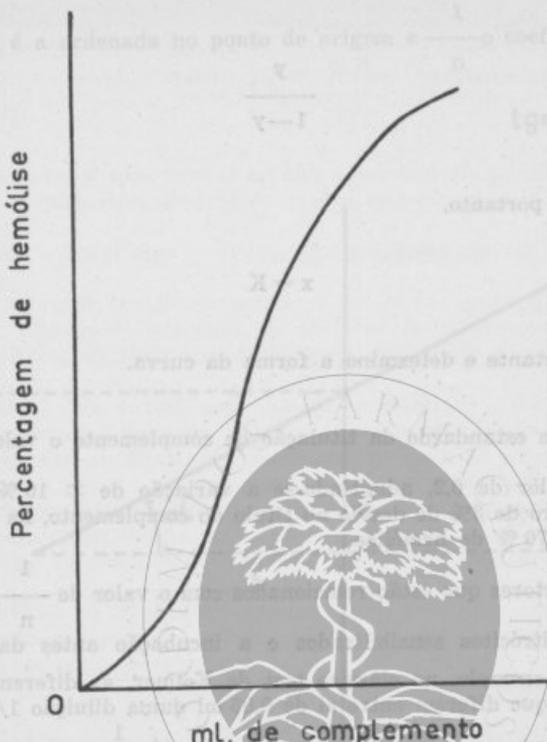


FIG. 2 — Relação entre a quantidade de complemento e a percentagem de hemólise

$C'H_{50}$  aumenta com a quantidade de células e varia inversamente com a força iónica do diluente.

O grau de lise diminui com o aumento de volume total em que a reacção tem lugar, tendo já sido explicada a razão deste facto.

Quanto ao efeito da temperatura, parece obter-se títulos mais elevados operando a  $30^{\circ}$ , por a esta temperatura ser maior a estabilidade de  $EAC'_{1,4,2}$  embora se necessite dum maior lapso de tempo para se atingir o final da reacção. Contudo a maioria das experiências levadas a cabo no estudo do complemento foram feitas à temperatura de  $37 \pm 0,2^{\circ}$ .

O pH, quando aumenta, interfere diminuindo a actividade lítica.

O efeito dos iões  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  foi já tratado anteriormente.

A curva em S que relaciona as quantidades de complemento e as respectivas percentagens de lise, pode exprimir-se pela equação de VAN KROGH:

$$x = K \left( \frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}}$$

em que  $x$  é a quantidade de complemento (em ml de soro diluído) e  $y$  o grau de hemólise expresso como uma fracção de 1. A constante  $K$  é a unidade 50% porque, neste ponto,

$$y = 0,5$$

e o termo

$$\frac{y}{1-y}$$

será igual a 1 e, portanto,

$$x = K$$

$\frac{1}{n}$  é outra constante e determina a forma da curva.

Nas condições estandarde da titulação de complemento o valor de  $\frac{1}{n}$  verificou-se ter o valor de 0,2, admitindo-se a variação de  $\pm 10\%$ , o que apenas representa um erro de 3% de desvio no título do complemento, na zona compreendida entre os 30-70 % de hemólise.

Dentre os factores que estão relacionados com o valor de  $\frac{1}{n}$ , citamos a concentração dos eritrócitos sensibilizados e a incubação antes da adição destes.

Quando, por exemplo, no clássico test de Kolmer, as diferentes quantidades de complemento (que diferem entre si de 0,05 ml duma diluição 1/30) se incubam 60 minutos antes da junção dos glóbulos, o valor de  $\frac{1}{n}$  obtido é bastante diferente de 0,2.

Tal facto deve-se à perda de actividade do complemento que tem lugar durante a incubação a 37°. Esta perda não é, porém, proporcional às quantidades presentes, sendo mais marcada naqueles tubos que contêm as maiores doses.

Por isso, no final da incubação, as quantidades de complemento que permanecem activas não se encontram diferindo entre si como as havíamos relacionado antes da incubação.

Um valor de  $\frac{1}{n}$  superior ou inferior ao citado erro permitido de 10%, invalida a titulação.

Aplicando logarítmos à equação de Van Krogh, esta tomará a forma:

$$\log x = \log K + \frac{1}{n} \log \left( \frac{y}{1-y} \right)$$

Esta expressão é a equação duma recta da forma

$$y = mx + b$$

Log K ( $C'H_{50}$ ) é a ordenada no ponto de origem e  $\frac{1}{n}$  o coeficiente angular da recta (Fig. 3).

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{a}{b} = \frac{1}{n}$$

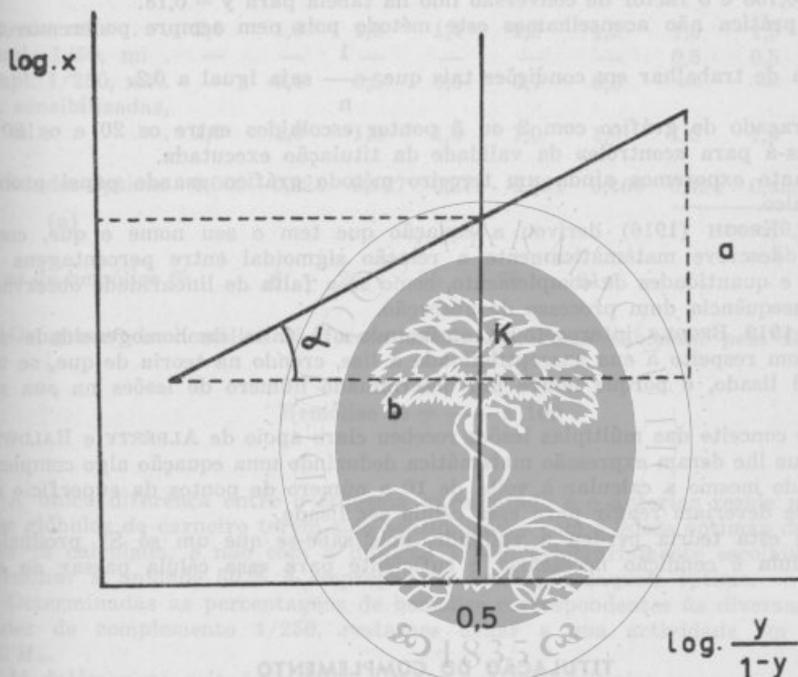


FIG. 3

Empregando papel logarítmico teremos apenas, na prática, que calcular o valor do termo  $\frac{1-y}{y}$ .

Se durante a titulação se observar rigorosamente o «contrôle» de todos os factores que a influenciam e, portanto,  $\frac{1}{n}$  for igual a 0,2, poder-se-á calcular

$C'H_{50}$  dispondo apenas dum valor situado na região da hemólise parcial compreendido entre os 20 e os 80 %, recorrendo a tabelas de factores de conversão (MALTANER, HEIDELBERGER e outros).

Estes factores derivaram-se atribuindo a  $C'H_{50}$  o valor 1 e fazendo  $\frac{1}{n} = 0,2$ . Então, a equação de Van Krogh tomará a forma:

$$x = \left( \frac{y}{1-y} \right)^{0,2}$$

e teremos x (quantidade de complemento com a qual se obtém a percentagem y de hemólise) relacionado com 1, dose de complemento que lisa 50 % das células dos sistema.

Um exemplo: se com 0,40 ml de complemento 1/250 se obtiveram 18 % de hemólise ( $y = 0,18$ ),  $C'_{50}$  será:

$$\frac{0,40}{0,738} = 0,54 \text{ ml}$$

O valor 0,738 é o factor de conversão lido na tabela para  $y = 0,18$ .

Na prática não aconselhamos este método pois nem sempre poderemos ter a certeza de trabalhar em condições tais que  $\frac{1}{n}$  seja igual a 0,2.

O traçado do gráfico com 2 ou 3 pontos escolhidos entre os 20 e os 80 % servir-nos-á para «contrôle» da validade da titulação executada.

Adiante exporemos ainda um terceiro método gráfico usando papel probit-logarítmico.

VAN KROGH (1916) derivou a equação que tem o seu nome e que, como sabemos, descreve matematicamente a relação sigmoidal entre percentagens de hemólise e quantidades de complemento, como se a falta de linearidade observada fosse consequência dum processo de absorção.

Em 1919 BROOKS interpretou-a atribuindo-a à falta de homogeneidade das células com respeito à sua susceptibilidade à lise, crendo na teoria de que, se um globulo é lisado, é porque houve um determinado número de lesões na sua superfície.

Este conceito das múltiplas lesões recebeu claro apoio de ALBERTY e BALDWIN (1951) que lhe deram expressão matemática deduzindo uma equação algo complexa e chegando mesmo a calcular à volta de 10 o número de pontos da superfície da célula que deveriam reagir para essa célula ser lisada.

Hoje esta teoria perdeu a validade, pois sabe-se que um só  $S^*$  produzido numa célula é condição necessária e suficiente para essa célula passar ao estado  $E^*$ .

## TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO

Já vimos ao tratar da determinação da dose óptima de hemolisina como se leva a cabo a titulação do complemento.

O sangue de vários cobaias, machos ou fêmeas não grávidas, deixa-se coagular à temperatura ambiente (1 hora), separam-se os soros, centrifugam-se, misturam-se e distribui-se em ampolas ou tubos a quantidade julgada necessária para usar em cada série de tests de fixação.

Estas ampolas ou tubos são rapidamente congelados. A temperatura de  $-30^{\circ}$  temos conservado complemento por espaço não inferior a 2 meses sem perda apreciável de actividade.

Outro método de conservação é o de RICHARDSON que faz uso de duas soluções em cloreto de sódio a 30,6 % e que são:

a) Borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) . . . . .	0,57 g
Azida de sódio . . . . .	0,81 »
b) Ácido bórico . . . . .	0,93 »
Borax . . . . .	2,29 »
Sorbitol . . . . .	11,47 »

De ambas soluções perfaz-se o volume de 100 ml, sendo a sua duração ilimitada. Com constante agitação, misturam-se 8 parte de soro com 1 parte do soluto a) e seguidamente com outra do soluto b). Guarda-se no frigorífico a  $5^{\circ}$ . Para uso, dilui-se um volume do soro conservado com sete de água destilada, obtendo-se

assim soro isotónico diluído 1/10, com o qual se farão as subseqüentes diluições necessárias com o diluente tamponado.

Repetiremos aqui o exemplo típico duma titulação de complemento (DE BRUIJN):

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluente, ml . . .	2,0	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,5	1,5	1,5
Compl. 1/50, ml . .	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5
Compl. 1/250, ml . .	—	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	—	—	—
Cel. sensibilizadas, ml . . . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Densidades ópticas	0,000	0,028	0,127	0,271	0,381	0,466	0,491	0,489	0,491
(a)							m = 0,490		
							(b)		
Graus de hemólise %	6	26	55	78	91				

Os graus de hemólise % foram calculados, como sabemos, pela fórmula:

$$\text{Hemólise \%} = \frac{a}{b} \times 100$$

A única diferença entre o esquema apresentado e o anterior reside no facto de os glóbulos de carneiro terem sido sensibilizados com a «dose óptima» de hemolisina já calculada, e não com a diluição 1/500, arbitrariamente escolhida para determinar a unidade 50 % a empregar na avaliação daquele óptimo.

Determinadas as percentagens de hemólise correspondentes às diversas quantidades de complemento 1/250, resta-nos achar a sua actividade em termos de C'H<sub>50</sub>.

Já falámos no método gráfico usando papel logarítmico no qual marcamos x (ordenadas) e  $\frac{1-y}{b}$  (abscissas), obtendo uma recta onde lemos a dose lítica correspondente a C'H<sub>50</sub>.

Usando este método é conveniente verificar se o valor de 1/n se encontra dentro dos limites permitidos numa correcta determinação.

Referimo-nos igualmente, desaconselhando-o, ao método dos factores de conversão que não nos permite controlar as condições em que se levou a efeito o ensaio.

Passamos a descrever o método usado no nosso laboratório.

Cada glóbulo apresenta, em relação ao agente hemolítico, uma resistência particular à lise que tem como consequência a necessidade duma concentração mínima, abaixo da qual o glóbulo restará intacto.

O número de hemácias destruídas por uma determinada concentração do agente hemolítico corresponde, assim, à quantidade de glóbulos que são incapazes de resistir.

Este fenómeno é semelhante à intoxicação dum grupo de animais por um tóxico.

O gráfico logaritmo-probabilidade aplicado às curvas sigmoides de toxicidade, que traduzem uma distribuição normal das resistências individuais dos animais, transforma-as numa recta.

Como o significado das curvas de hemólise é o mesmo, podemos também transformá-las em rectas quando lhe aplicamos o método gráfico descrito para a me-

dida das toxicidades, isto é, marcando em ordenadas os logaritmos das doses e em abscissas as percentagens definidas pelo seu probit.

A inclinação da recta da hemólise traduz a dispersão da resistência das hemácias à volta do seu valor médio, quer dizer, o desvio estandar.

A actividade do complemento pode pois medir-se cómodamente pelo processo descrito, definindo-a, por analogia com a dose letal 50 %, pelo ponto de hemólise 50 %.

Usando papel probit-logarítmico teremos apenas de marcar em ordenadas as quantidades de complemento 1/250 e em abscissas as respectivas percentagens de hemólise (fig. 4).

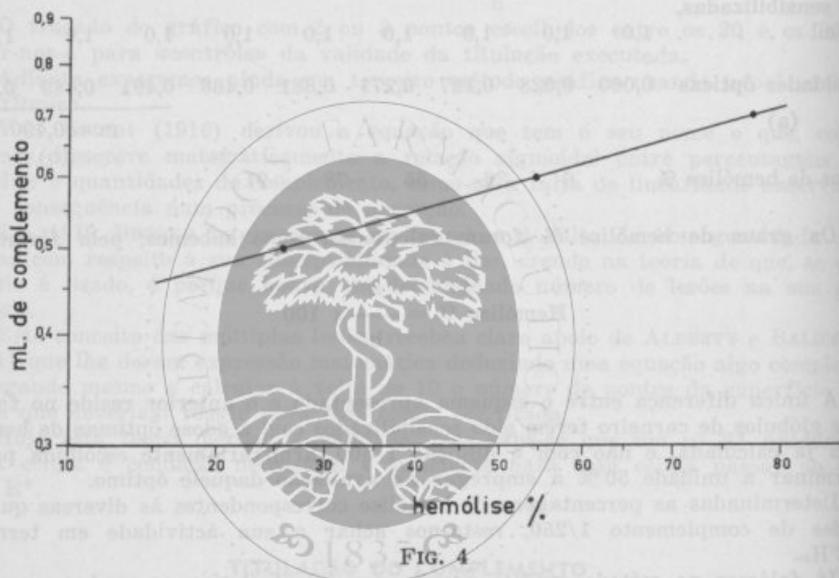


FIG. 4

Dois pontos (um abaixo e outro acima dos 50 % na zona dos 20-80 %) seriam suficientes, mas é conveniente fazer passar a recta por três.

Lendo no gráfico a quantidade de complemento 1/250 correspondente à percentagem 50, não temos mais que aplicar a fórmula

$$y = \frac{2,5}{x}$$

para sabermos a que diluição se deve submeter o complemento puro de forma a conter, em 0,5 ml, 5C'H<sub>50</sub>, que é a dose a usar no test de fixação.

#### TEST DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO

Como sabemos, o test de fixação de complemento processa-se em dois tempos: durante o primeiro reagem, sob determinadas condições de temperatura (não está esclarecido o motivo porque o número de C'H<sub>50</sub> fixadas é maior se a reacção se realizar a baixa temperatura do que a 37°. Se, por um lado, C'<sub>1</sub>, C'<sub>2</sub> e C'<sub>4</sub> não são influenciados, a fixação de C'<sub>3</sub> está relacionada intimamente com a temperatura) o soro que se presume conter anticorpo, complemento em quantidade previamente doseada e antigénio; no segundo adicionam-se à mistura anterior células de car-

neiro sensibilizadas. Incuba-se a 37° durante um tempo variável com a técnica usada e faz-se a leitura dos resultados. Se o soro examinado continha anticorpo para o antigénio usado, o complemento fixa-se sobre o complexo anticorpo-antigénio formado e, por essa razão, não resta complemento livre para lisar as células sensibilizadas. É o caso duma reacção positiva.

Se, por outro lado, há hemólise, tal facto indica que o complemento não foi fixado, por falta de anticorpo existente no soro problema (reacção negativa).

Um dos factores primordiais, já o dissemos, para a obtenção de correctos e reproduzíveis resultados, é a quantidade de complemento usada, tornando-se por isso essencial que a sua titulação seja rigorosamente conduzida. Implicitamente, todos os factores que influenciam a actividade hemolítica do complemento devem, de igual modo, ser devidamente controlados.

Mercê de trabalhos experimentais concluiu-se que 5C'H<sub>50</sub> é a quantidade conveniente para empregar nos tests de fixação. Se o complexo antigénio-anticorpo fixar todas essas cinco unidades, não haverá hemólise do sistema indicador constituído pelas células sensibilizadas. Se, porém, somente quatro das cinco unidades adicionadas forem fixadas, a restante 1C'H<sub>50</sub> é suficiente para lisar 50 % das células presentes. Também experimentalmente se observou que a fixação de menos de quatro unidades das cinco contidas no sistema (fixação que se traduz por mais de 50 % de lise) é usualmente referida como uma reacção negativa.

Escolheu-se este ponto final da fixação de complemento para reduzir, tanto quanto possível, reacções positivas falsas encontradas como consequência duma série de factores técnicos. A sensibilidade do test de fixação pode ser aumentada adoptando como ponto final a fixação apenas de três das cinco unidades ou usando ainda 4C'H<sub>50</sub> e tomando como ponto final a fixação de 2C'<sub>50</sub>. Atendendo contudo a que, em regra, se usam pequenos volumes e que na medida desses volumes se podem cometer erros de 10-20 %; que alguns dos reagentes podem ser ligeiramente anti-complementares e que, segundo as condições experimentais em curso, a actividade hemolítica de C' pode sofrer deteriorações de 10-25 %, é conveniente empregar uma dose (5C'H<sub>50</sub>) capaz de garantir suficiente margem de segurança. A actividade hemolítica de C' pode também ser alterada com a presença de bactérias e fungos, pela formação de complexos entre essas bactérias ou fungos e seus possíveis anticorpos existentes no soro de cobaio. É pois necessário evitar a contaminação dos reagentes, eliminando assim uma provável origem de reacções positivas falsas. Os soros a examinar devem ser tanto quanto possível recentes, pois tendem, após prolongada armazenagem, a tornarem-se, por vezes, anti-complementares.

Damos a seguir o esquema do test de fixação estandardizado segundo DE BRUIJN que temos vindo descrevendo.

DILUIÇÕES DO SORO		1:1	1:2	1:4	1:8	.....
Diluyente, ml . . . . .	0,25	—	0,25	0,25	0,25	.....
Soro, ml . . . . .	0,25	0,25	0,25			
				└ 0,25		
					└ 0,25	.....
Antigénio dil., ml . . . . .	—	0,25	0,25	0,25	0,25	.....
Complemento (10 unid/ml), ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	.....

Após um período de fixação de 16 horas a 5°, incubam-se os tubos 15 minutos a 37°, após o que recebem 0,5 ml de glóbulos «óptimamente sensibilizados», sofrendo seguidamente nova incubação a 37° por espaço de 30 minutos (este tempo não

é suficiente para se atingir o ponto final na reacção, mas, visto a leitura ser feita visualmente, carece de importância prolongá-lo).

Os resultados, no test qualitativo (usam-se apenas os dois primeiros tubos) são dados como positivo, negativo ou duvidoso e na técnica quantitativa expressos pelo título, que é a diluição do último tubo que não apresenta hemólise completa.

#### BIBLIOGRAFIA

- BLISS, C. I.: *Quart. J. Pharm. and Pharmacol.*, **11**, 192 (1938).
- BONET-MAURY, P. et CHOUTEAU, J.: *C. R. Soc. Biol.* (Paris) 19-20, (1943).
- CAMUÑEZ, J. E.: *El Lab. en las Enf. Veneras*, (Ed. Salvat.), (1947).
- D'ALESSANDRO, G. e ZAFFIRO, P.: *Riv. dell'Istit. Sieroterapico Ital.*, 36-4, (1961).
- DARTER, L. A.: *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 653, (1953).
- DE BRUIJN, J. H.: *Acta dermat.-venereol., Proc. 11th. Internat. Congr. Dermat.*, vol. 111.
- DE BRUIJN, J. H.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **24**, (1958).
- DE BRUIJN, J. H.: *Acad. proefschrift*, Utrecht, (1961).
- DE BRUIJN, J. H.: *Comunicações pessoais*.
- FAIRBROTHER, R. W.: *A Textbook of Bacteriology*, London, (1960).
- GRADWOHL, R. B. H.: *Clinical Lab. Meth. and Diagnosis*, C. V. Mosby Comp., (1948).
- KABAT, E. A. and MAYER, M. M.: *Exp. Immunochemistry*, Charles C. Thomas, Pub., 1961.
- KENT, J. F.: *J. Lab. Clin. Med.*, **31**, 1270 (1946).
- MAYER, M. M., OSLER, A. G., BIER, O. G. e HEIDELBERGER, M.: *J. Exp. Med.*, **84**, 535, (1946).
- MAYER, M. M.: *Annual Rev. of Bioch.*, **20**, (1951).
- MONTGOMERY, C. H., SUHLAND, S. e KNOX, J. M.: *Lab. Digest*, **24**, (1960).
- SAINT-MARTIN, M.: *The Can. J. of Med. Technology*, **23**, (1961).
- SCHAAP, G. J. P.: *Acad. proefschrift*, Amsterdam, (1961).
- Serologic Tests for Syphilis*, Manual, 1959, PHS Publications 411.
- STERA, C. A.: *Trat. de Serol. e Imunologia*, (Ed. Alfa, 1959).
- WADSWORTH, S. C.: *Métodos Standard de Lab. del Dep. de Sanidad del Est. de Nueva York*, (Ed. Labor., 1943).

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

## IV SECÇÃO

### TENDÊNCIAS MODERNAS DA QUÍMICA FORENSE

A. CORREIA RALHA

Director do Laboratório de Polícia Científica

Química forense ou Química legal é, segundo a definição de LUCAS (1), a Química aplicada ao esclarecimento de certas questões que a administração da Justiça levanta, ou seja, ainda, a Química exercida ao serviço da Lei.

É muito vasto o campo da Química forense e dificilmente se podem limitar os casos em que ela pode intervir. Na verdade, além dos problemas ligados ao aspecto especial da Toxicologia, muitos outros, de natureza diferente, podem ser solucionados pela Química forense.

Porém, todos esses problemas apresentam algumas características gerais comuns, que passamos a indicar:

— Amostras, geralmente, em quantidades diminutas, muitas vezes misturadas com quantidades, proporcionalmente importantes, de outras substâncias (impurezas, sujidades, metabolitos, etc.).

— Vantagem em não destruir toda a amostra, para o caso de virem a ser interpostos recursos.

— Conveniência em obter um registo gráfico, isto é, de qualquer modo, uma prova adicional das conclusões do perito.

## Centro de Documentação Farmacêutica

A TOXICOLOGIA COMO O RAMO MAIS IMPORTANTE

da Química Forense Farmacêuticos

O grande número de novos produtos comercializados que surgiram depois da última guerra (medicamentos, pesticidas, corantes, plásticos, lubrificantes, etc.) veio necessariamente tornar muito mais complexa e difícil a análise toxicológica.

Vai longe o tempo em que o arsénio era o tóxico mais frequentemente encontrado nas peritagens. Hoje, os pesticidas, de tão larga aplicação na Agricultura e na Pecuária, tomaram-lhe o lugar, o mesmo acontecendo com certos alcalóides clássicos que estão sendo, também neste aspecto, ultrapassados por numerosos medicamentos de síntese orgânica.

Porém, a evolução não se deu apenas no sector da indústria preparadora desses compostos, potencialmente perigosos, pois não foi menor no ramo da química analítica, particularmente no dos métodos instrumentais. Depois da guerra passada, técnicas como a cromatografia de papel e a cromatografia em fase gasosa, a extracção líquido-líquido em contra-corrente, a espectrografia nos seus múltiplos aspectos (emissão, UV, IV, NMR, difracção de raios X, etc.) evoluíram de ma-

neira tão fulgurante que tornaram facilísimas certas separações e identificações antes impossíveis.

Nas breves considerações que vamos fazer à volta destes problemas, trataremos, em primeiro lugar, da Química toxicológica e, dentro desta, da pesquisa de tóxicos minerais.

Também, neste sector limitado se verificaram progressos, como por exemplo, o aperfeiçoamento dos métodos de destruição da matéria orgânica.

O estudo comparativo de todos os processos conhecidos permitiu a MIDDLETON e STUCKEY (1) e (2) o estabelecimento de um método mais rápido e simples, e em que as perdas são mínimas.

A espectrografia de emissão passou a permitir a detecção simultânea dos diversos tóxicos minerais. Resultado idêntico, mas ainda mais completo, se consegue com o emprego das modernas técnicas de espectrografia de difracção de raios X (fluorescência).

A dosagem do arsénio, graças aos trabalhos de CRIBIER e GRIFFON (3), (4) e (5), foi levada muito mais longe pois permite já detectar menos de 1 µg de arsénio, conseguindo-se assim determinar a distribuição do arsénio nos cabelos e conhecer o tempo aproximado que decorreu depois da ingestão do tóxico (tendo em conta que os cabelos crescem, em média, cerca de 1 cm por mês). A evolução rapidíssima dos conhecimentos sobre a energia nuclear veio também, indirectamente, contribuir para o aperfeiçoamento da detecção do arsénio. A radioactivação permite conhecer a distribuição do arsénio num só cabelo (6), (7) e (8).

Dos casos que têm sido submetidos a exame no Laboratório de Polícia Científica, citamos um em que se suspeitava que tinha sido vítima de intoxicação arsenical um doente que fora internado, seis meses antes, em estado grave, e que, entretanto, recuperara completamente.

A análise dos cabelos forneceu os seguintes resultados:

QUADRO I

Porção dos cabelos	Datas aproximadas correspondentes	As em µg/100 g de cabelos
3 cm	0-3 meses	134
3 cm	3-6 meses	776
4-6 cm	mais de 6 meses	1773

que confirmavam inteiramente a suspeita.

Um outro caso de identificação de tóxicos minerais a que procedemos, e que se nos afigura pouco frequente, foi o de uma pequena porção (poucos mg) de um produto esbranquiçado.

O diagrama de raios X (Quadro II) e o espectro IV (fig. 1) mostram que se tratava de sulfato de cálcio. O gesso, quando ingerido em quantidades apreciáveis, pode provocar a obstrução do piloro devido ao facto de endurecer rapidamente após a absorção de humidade.

## QUADRO II

Valores de *d* descritos por J. D. HANAWALT, A. W. RINN e L. K. TREVET  
*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 10, (1938)

Sulfato de cálcio anidrido	Sulfato de cálcio com ½ molécula de água	Sulfato de cálcio (duas moléculas de água)	Produto suspeito (*)
3,89	6,0	7,7	5,746
3,49 (I)	3,48	4,29 (I)	4,186
3,11	3,00 (II, III)	3,81	3,32
2,85 (II)	2,80 (I)	3,06 (II, III)	2,87 (I)
2,46	2,34	2,87 (II, III)	2,68 (II)
2,32 (III)	2,13	2,68	2,57
2,26	1,85 (II, III)	2,48	2,23
2,20	1,74	2,22	2,03
2,08	1,69	2,07	1,77 (III)
1,99	1,53	1,88	1,657
1,93	1,47	1,79	1,621
1,86	1,445	1,66	1,59
1,74	1,350	1,62	1,47
1,64	1,300	1,58	1,42
1,59	1,262	1,435	1,39
1,56	1,243	1,360	1,31
1,52	1,210	1,325	1,264
1,487	1,150	1,270	1,20
1,420	1,125	1,240	1,17
1,395	1,070	1,200	1,142
1,360	1,038	1,138	
1,318	1,012	1,083	
1,296	1,000	1,037	
1,275	0,958	0,977	
1,215	0,920		
1,197			
1,163			
1,103			

(\*) Valores obtidos neste Laboratório.

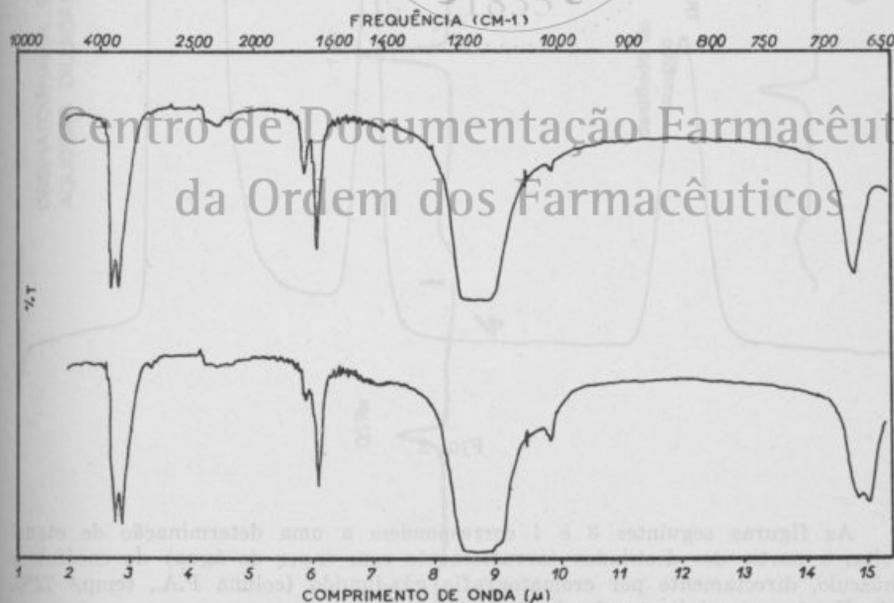


FIG. 1

Claro que a identificação do sulfato de cálcio podia fazer-se por meios químicos. Corria-se, porém, o risco de gastar a amostra, talvez antes da identificação estar feita, se o caso fosse complicado.

Para os tóxicos gasosos e voláteis (minerais ou orgânicos) a extracção com dissolventes, a microdifusão, o arrastamento com ar ou azoto, a destilação e, mais recentemente, a cromatografia em fase gasosa (gás-líquido e gás-sólido) <sup>(10)</sup>, <sup>(11)</sup>, <sup>(12)</sup>, <sup>(17)</sup>, <sup>(18)</sup>, <sup>(19)</sup> e <sup>(20)</sup>, são os métodos usualmente seguidos, para o isolamento.

Apresentaremos, a seguir, também alguns exemplos de identificação e dosagem de tóxicos voláteis realizados no L. P. C.

A fig. 2 mostra o isolamento e identificação de clorofórmio e tricloroetileno, feitos por cromatografia gás-líquido (coluna C, temp.<sup>a</sup> 80°C, gás H<sub>2</sub>).

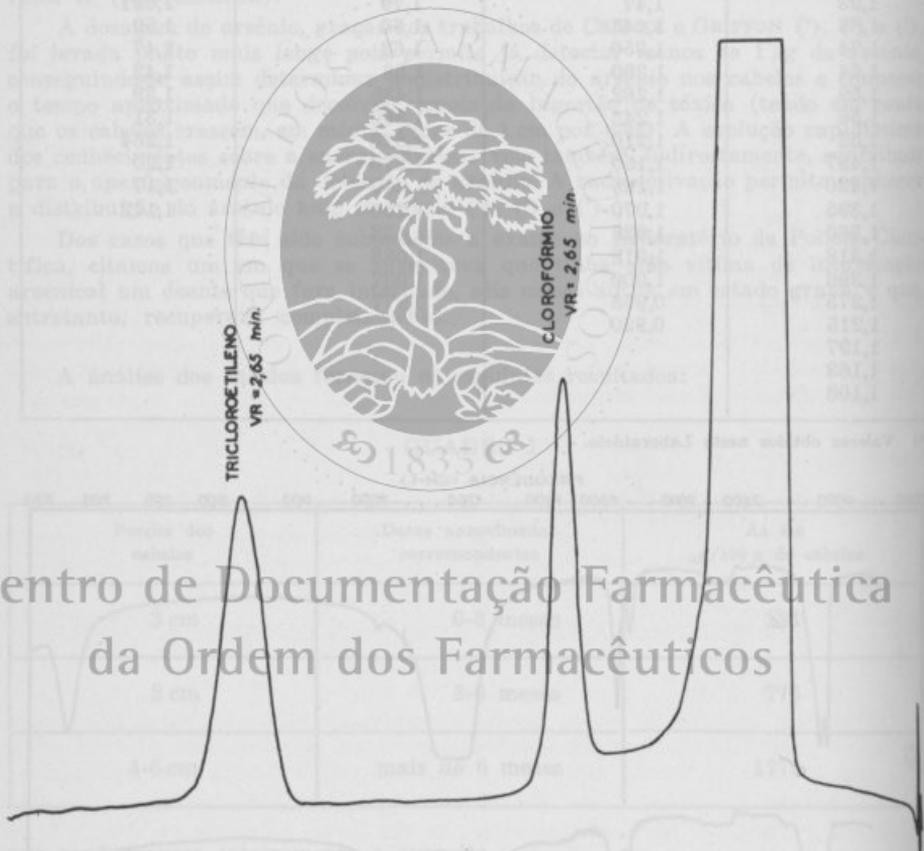


FIG. 2

As figuras seguintes 3 e 4 correspondem a uma determinação de etanol feita, a partir dos destilados (arrastamento com vapor de água) de encéfalo e músculo, directamente por cromatografia gás-líquido (coluna P.A., temp.<sup>a</sup> 72°C, gás H<sub>2</sub>, detector de ionização de chama).

CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO DE SOLUÇÕES  
AQUOSAS DILUIDAS DE ALCOOL ETÍLICO.



FIG. 3

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

OUTROS RAMOS DE QUÍMICA FORENSE

Executaram-se os cromatogramas a 1 a 4 para estabelecer a curva de calibração para a análise quantitativa. Note-se que o cromatograma 4 foi tirado com 5  $\mu$ l de uma solução aquosa que apenas continha 0,5 ml de etanol por litro.

A utilização da cromatografia gás-líquido, com detector da ionização de chama e coluna apropriada, virá certamente a constituir o método mais prático e seguro de dosagem (e identificação) do álcool nos líquidos orgânicos, como sangue e urina, e igualmente nos destilados de órgãos (encéfalo, músculo, etc).

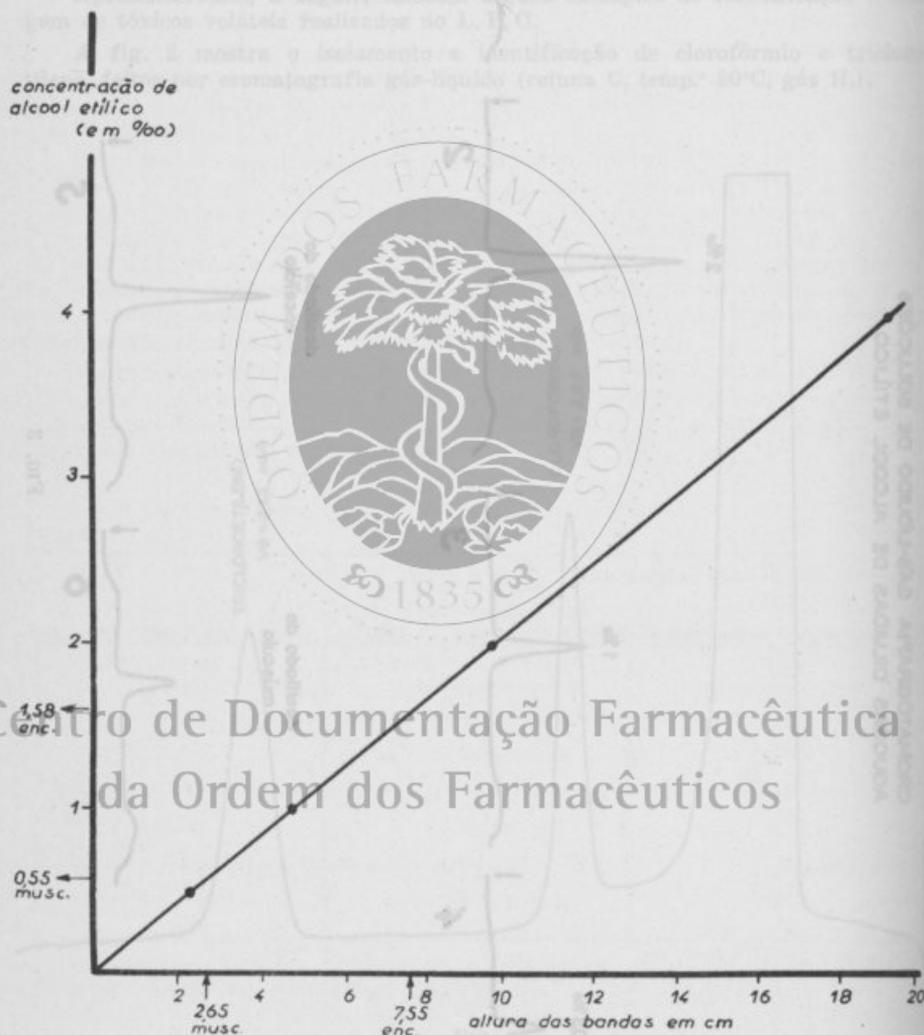


FIG. 4

Os métodos até agora preferidos têm sido o de CAVETT (micro) e o de KOZELKA e HINE (macro) <sup>(13)</sup>, <sup>(14)</sup>, <sup>(15)</sup> e <sup>(16)</sup>.

Em relação aos tóxicos gasosos referir-nos-emos, particularmente, ao caso do óxido de carbono por ser, entre nós, o que mais frequentemente provoca intoxicações (principalmente acidentais e suicidas).

Aos métodos espectrofotométricos no visível <sup>(21)</sup>, <sup>(22)</sup> e <sup>(23)</sup>, vieram juntar-se os de infravermelho <sup>(24)</sup> e <sup>(25)</sup> e os de cromatografia gás-sólido <sup>(26)</sup>. Estes últimos tipos de métodos foram considerados, o primeiro, para o estudo da poluição da atmosfera, e, o segundo, para o estudo do grau de oxicarbonémia dos aviadores vítimas de acidentes <sup>(27)</sup>.

Quanto aos tóxicos orgânicos, o método clássico de STASS-OTTO — que permite a separação dos compostos de acordo com o carácter ácido, neutro ou alcalino — foi muito melhorado <sup>(28)</sup>, <sup>(29)</sup> e <sup>(30)</sup> e passaram a usar-se novos métodos que conduzem já à separação dos compostos, mesmo dentro desses grandes grupos (extração líquido-líquido em contra-corrente, cromatografia de coluna, de distribuição, cromatografia de papel e de placa, electroforese, etc.) <sup>(31)</sup>, <sup>(34)</sup>, <sup>(35)</sup>, <sup>(36)</sup>, <sup>(37)</sup> e <sup>(38)</sup>.

A catalogação dos valores de Rf, obtidos na cromatografia de papel <sup>(31)</sup> a <sup>(32)</sup>, <sup>(39)</sup>, <sup>(40)</sup>, <sup>(41)</sup>, <sup>(42)</sup>, <sup>(43)</sup> e dos espectros de UV, <sup>(44)</sup>, <sup>(45)</sup>, <sup>(46)</sup>, <sup>(47)</sup>, <sup>(48)</sup>, IV <sup>(49)</sup>, <sup>(50)</sup>, <sup>(51)</sup>, <sup>(52)</sup>, Raios X <sup>(53)</sup>, <sup>(54)</sup>, <sup>(55)</sup>, <sup>(56)</sup> e, mais recentemente, de NMR, feita com vista aos compostos com interesse potencial em química forense, ou com âmbito mais geral <sup>(57)</sup>, <sup>(58)</sup>, <sup>(59)</sup>, <sup>(60)</sup>, <sup>(61)</sup>, <sup>(62)</sup>, <sup>(63)</sup>, <sup>(64)</sup> e <sup>(65)</sup>, simplificaram extraordinariamente a tarefa do químico forense.

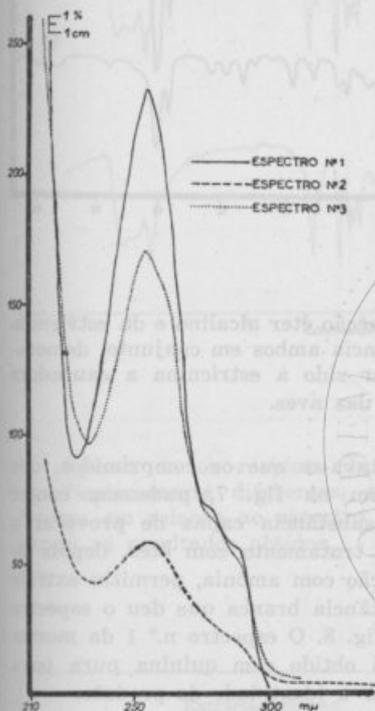


Fig. 5

## Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

### OUTROS RAMOS DA QUÍMICA FORENSE

São muito variados e numerosos os ramos em que a Química forense poderia dividir-se. Poder-se-iam nela incluir os capítulos da química dos explosivos <sup>(66)</sup>, <sup>(67)</sup>, e <sup>(68)</sup>, da dos plásticos <sup>(69)</sup>, <sup>(70)</sup>, <sup>(71)</sup> e <sup>(72)</sup>, da das tintas e vidros <sup>(73)</sup> e <sup>(74)</sup>, da das pedras preciosas <sup>(75)</sup>, <sup>(76)</sup> e <sup>(77)</sup>, da química relacionada com a análise de documentos <sup>(78)</sup>, <sup>(79)</sup>, <sup>(80)</sup>, <sup>(81)</sup>, <sup>(82)</sup>, <sup>(83)</sup>, <sup>(84)</sup> e <sup>(85)</sup>, etc. etc.

Para mostrar como os problemas podem surgir na Química forense, e como devem ou podem ser abordados, resolvidos e interpretados os seus resultados, citaremos alguns casos práticos do L. P. C.

A fig. 5 apresenta, com os n.º 1, 2 e 3, respectivamente, os espectros U.V., tirados com estricnina pura e com as fracções éter ácido e éter alcalino (Stass-Otto) de umas vísceras de pombos.

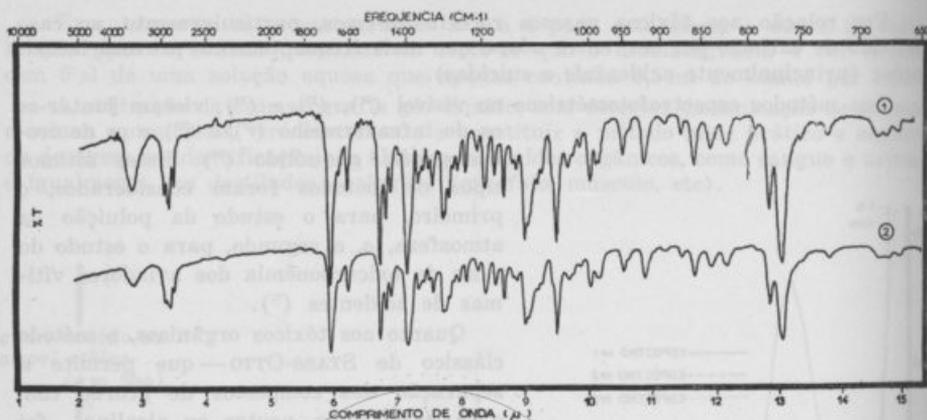


FIG. 6

Na fig. 6 vêem-se os espectros de I.V. da fracção éter alcalino e da estricnina pura. Qualquer desses espectros, mas de preferência ambos em conjunto, demonstraram ter sido a estricnina a causadora da morte das aves.

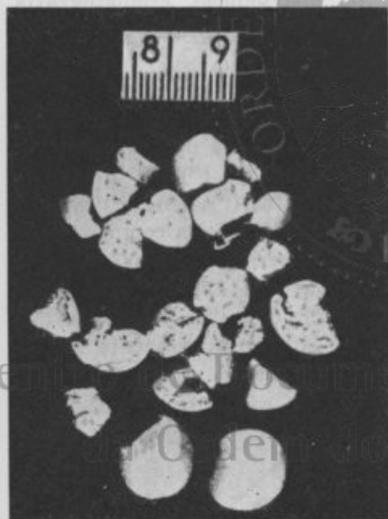


FIG. 7

Suspeitava-se que os comprimidos, que se mostram na fig. 7, pudessem conter qualquer substância capaz de provocar o aborto. O tratamento com éter, depois de alcalinização com amónia, permitiu extrair uma substância branca que deu o espectro n.º 2 da fig. 8. O espectro n.º 1 da mesma figura foi obtido com quinina pura para demonstrar a identidade do produto.

Um trigo que nos foi enviado para exame provocara a morte de numerosas aves de capoeira às quais fora dado como alimento. Não se tendo encontrado, por espectrografia de emissão, a presença de riscas que pudessem justificar a existência de tóxicos minerais, fez-se uma extracção tendente a procurar tóxicos orgânicos. O quadro seguinte mostra os resultados

da extracção feita com o trigo suspeito e com um trigo usado para comparação.

## QUADRO III

Material extraído	Quantidade usada	Resíduo da fracção éter-ácido
Trigo suspeito	2,138 g	35,5 mg
Trigo de comparação	2,079 g	29,1 mg

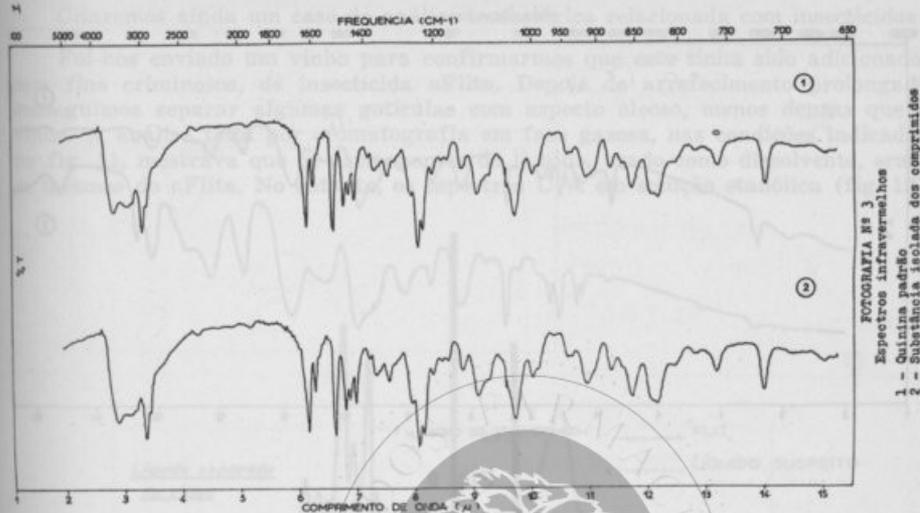


FIG. 8

Apesar de os resíduos da fracção «éter-ácido» não apresentarem valores significativamente diferentes, comportavam-se, no entanto, de maneira muito diversa em relação ao espectro ultravioleta. Assim, no Quadro IV podem observar-se os resultados obtidos.

QUADRO IV

Extractos etéreos	E 1% a 271 mμ
do Trigo suspeito	95,2
do Trigo de comparação	9

A localização do máximo no espectro e as condições em que fora obtida a fracção respectiva, faziam suspeitar de um insecticida fosforado. Tal suposição foi confirmada por cromatografia de papel; (\*) (papel impregnado com parafina; fase móvel: etanol, acetona, água (1:1:2); revelador: N-bromosuccinimida seguida de fluoresceína) e, sobretudo, pelo espectro I.V. (espectro n.º 1 da fig. 9) obtido depois de prévia purificação por cromatografia com coluna de alumina activada (eluente-clorofórmio). O espectro n.º 2 da mesma figura foi tirado com paratião puro. Fora, portanto, o paratião o responsável pela morte das aves.

Recebemos um certo dia um frasco com água e duas latas contendo, respectivamente, café e açúcar, produtos que se supunha estarem envenenados. Extracções com dissolventes orgânicos, seguidas de purificação dos resíduos, por cromatografia em coluna de alumina, permitiram obter os espectros I.V. da fig. 10 que se apresentavam idênticos ao obtido com o insecticida clorado, endrina.

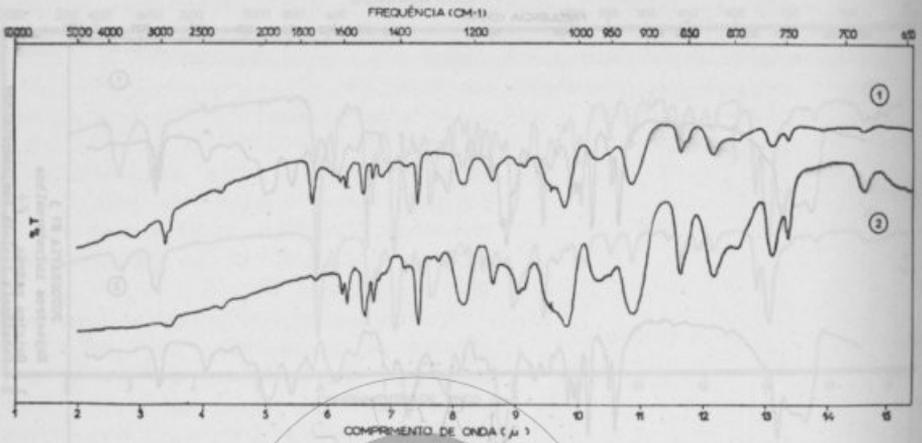


FIG. 9

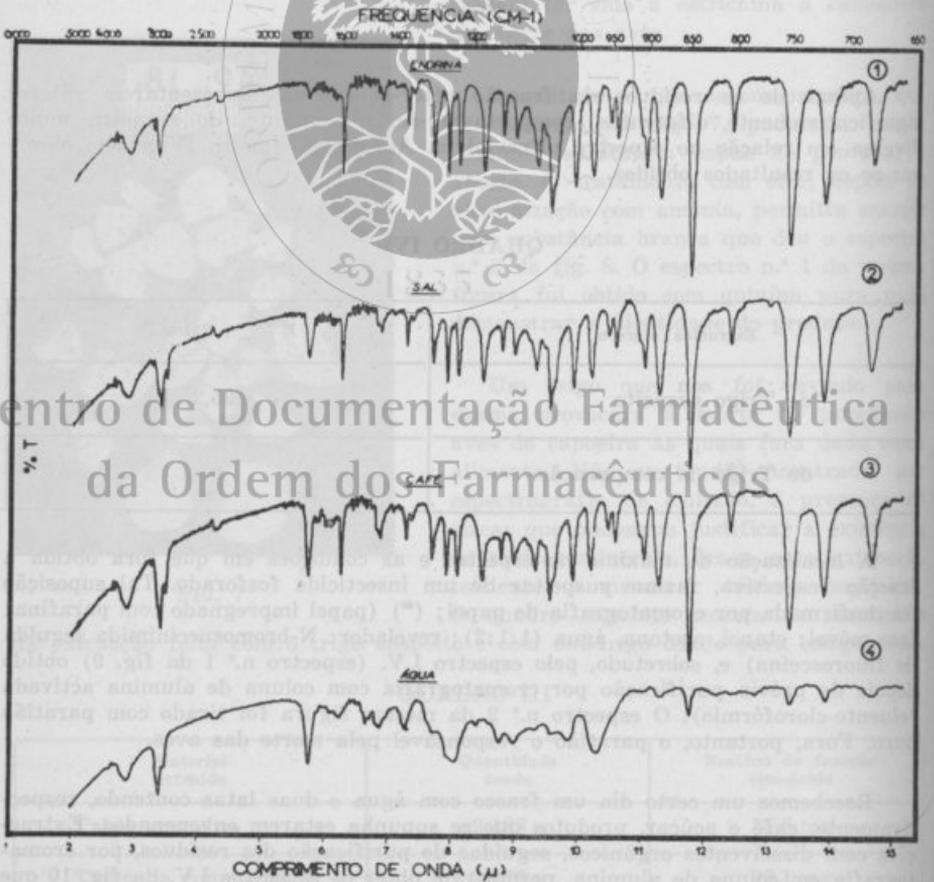


FIG. 10

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

Citaremos ainda um caso de análise toxicológica relacionada com insecticidas:

Foi-nos enviado um vinho para confirmarmos que este tinha sido adicionado, com fins criminosos, de insecticida «Flit». Depois de arrefecimento prolongado conseguimos separar algumas gotículas com aspecto oleoso, menos densas que o vinho. A análise feita por cromatografia em fase gasosa, nas condições indicadas na fig. 11, mostrava que os componentes do líquido, usado como dissolvente, eram os mesmos do «Flit». No entanto, os espectros U.V. em solução etanólica (fig. 12)

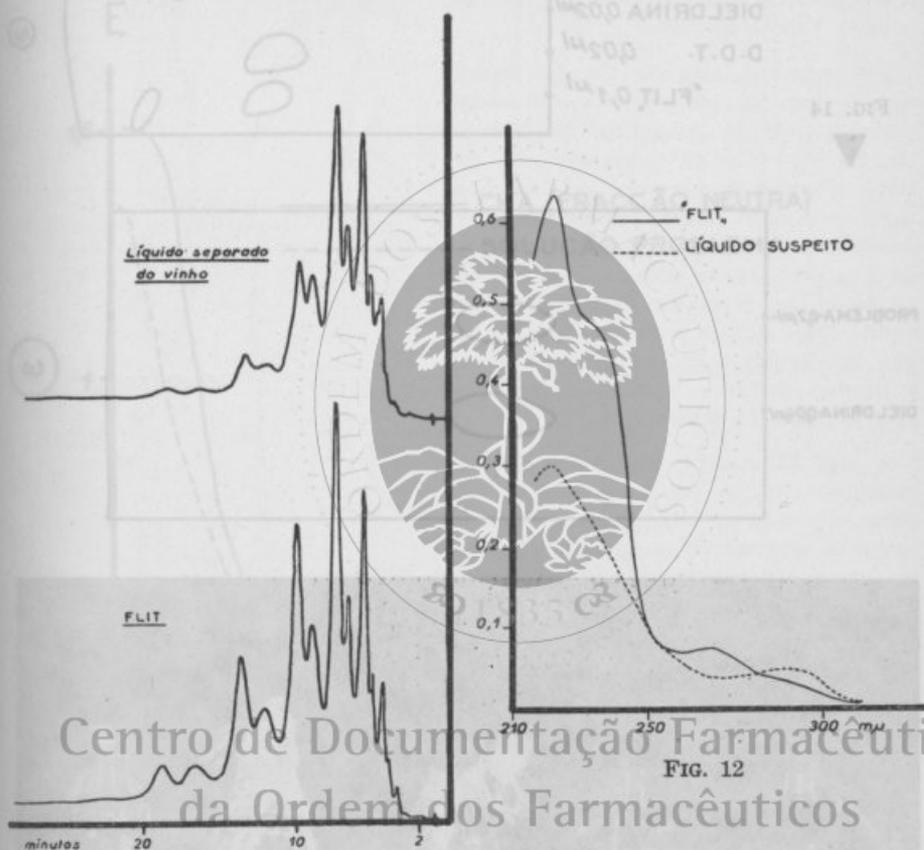


FIG. 11

eram perfeitamente distintos e a cromatografia de papel feita segundo MITCHEL<sup>(87)</sup> (fig. 13) não deu quaisquer manchas com o líquido suspeito. Porém, usando a técnica de MITCHEL<sup>(88)</sup> modificada para detectar dieldrina, obteve-se já uma mancha com o mesmo valor de Rf da dieldrina pura (fig. 14).

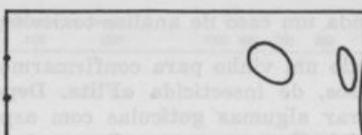
A análise cromatográfica (cromatografia de papel) mostrou assim que o líquido suspeito não continha DDT nem Lindano (existentes no «Flit») mas apenas Dieldrina.

Apresentaremos, a seguir, outros exemplos da aplicação da Química forense fora já do âmbito da Toxicologia.

Referir-nos-emos, a um caso de whisky falsificado, sem álcool, que se pensou, a princípio, ser um simples infuso de chá (fig. 15). No entanto, um simples es-

FIG. 13

"FLIT, 0,1 $\mu$ l  
 PROBLEMA 0,1 $\mu$ l

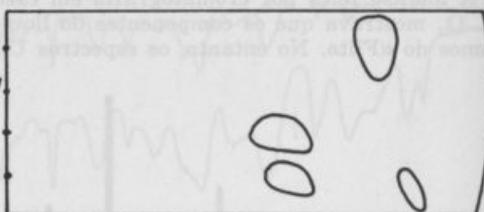


①

FIG. 14

LINDANO 0,02 $\mu$ l  
 DIELDRINA 0,02 $\mu$ l  
 D. D. T. 0,02 $\mu$ l

"FLIT, 0,1 $\mu$ l



②

PROBLEMA-02 $\mu$ l

DIELDRINA-004 $\mu$ l



③



FIG. 15

pectro U.V. fez afastar essa hipótese (fig. 16). A cromatografia de papel (fig. 17) veio mostrar tratar-se de água corada com castanho chocolate que é constituído pela mistura de três corantes autorizados: vermelho n.º 2 (amarante), azul n.º 2 (indigotina Ia) e amarelo n.º 5 (tartarazina).

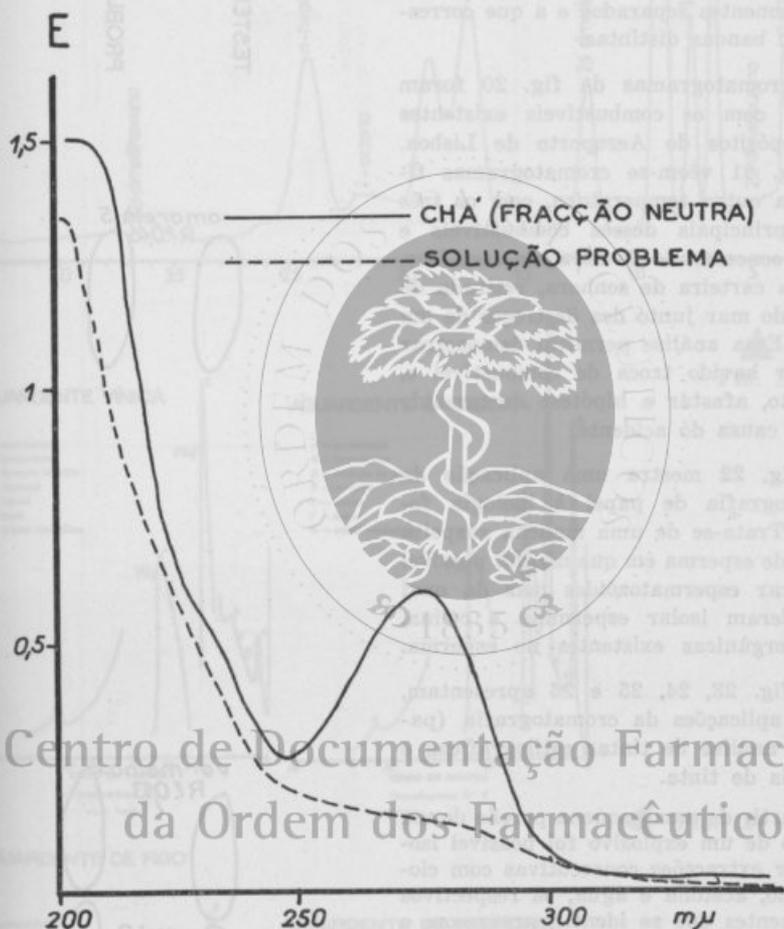


FIG. 16

A cromatografia em fase gasosa é uma das técnicas mais recentes da química analítica mas contam-se já por milhares os trabalhos científicos que relatam a sua aplicação e são também já muito numerosos os que estão ligados directamente à química forense.

No Laboratório de Polícia Científica, esta técnica tem-nos ajudado a resolver numerosos problemas não só de toxicologia, (de que apresentámos antes três exemplos) como também de Química forense de um modo geral. A fig. 18 corresponde a uma identificação de éter de petróleo, relacionada com um caso de incêndio, conseguida apenas com 5  $\mu$ l de amostra. Os cromatogramas da fig. 19 mostram como é possível determinar a origem de aguardentes pelas proporções relativas de 5 componentes separados e a que correspondem bandas distintas.

Os cromatogramas da fig. 20 foram tirados com os combustíveis existentes nos depósitos do Aeroporto de Lisboa. Na fig. 21 vêem-se cromatogramas tirados a outra temperatura, com os três tipos principais desses combustíveis e com o concentrado da lavagem com éter, de uma carteira de senhora, retirada do fundo do mar junto dos destroços de um avião. Essa análise permitiu demonstrar não ter havido troca de combustível e, portanto, afastar a hipótese de ter sido essa a causa do acidente.

A fig. 22 mostra uma aplicação da cromatografia de papel à biologia forense. Trata-se de uma mancha suspeita de ser de esperma em que não foi possível encontrar espermatozóides mas da qual se puderam isolar espermina e colina, bases orgânicas existentes no esperma.

As fig. 23, 24, 25 e 26 apresentam, ainda, aplicações da cromatografia (papel) à análise de tintas estilográficas e de lápis de tinta.

A partir de uma pequena porção de um resíduo de um explosivo foi possível isolar, por extracções consecutivas com clorofórmio, acetona e água, os respectivos componentes que se identificaram com o auxílio dos espectros I.V. respectivos. Na fig. 27 apresenta-se, com esses espectros, o nome dos componentes e as proporções em que se encontravam na mistura.

Num local em que se deu uma explosão encontraram-se vestígios de um produto sólido esbranquiçado que deu um espectro de difracção de raios X (fig. 28)

perfeitamente idêntico ao obtido com cloreto de sódio puro. Tal facto levou a admitir que o explosivo pudesse ter sido o clorato de sódio, usado, por vezes, como herbicida, e que daria cloreto de sódio como produto de decomposição.

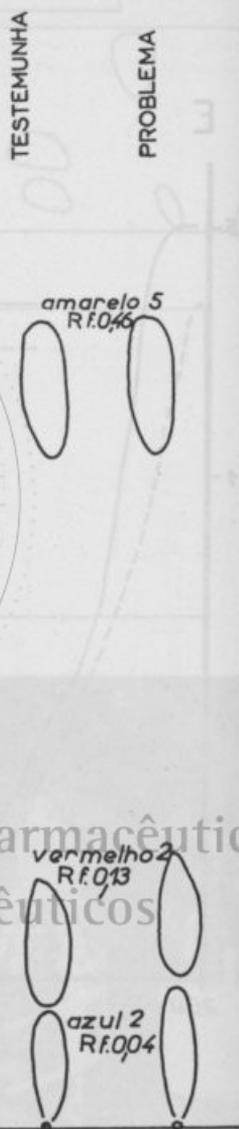


FIG. 17

Coluna B - 2m  
 (Fase estacionária :  
 sebacato de  $\alpha$ -2- etilhexilo  
 Fraktometer Perkin-Elmer Tipo 116  
 Fase móvel: Hidrogênio  
 Caudal: 20ml/min; Pressão 1kg/cm<sup>2</sup>  
 Temperatura: 50°C  
 Quantidade de material submetido  
 à análise - 5 $\mu$ l

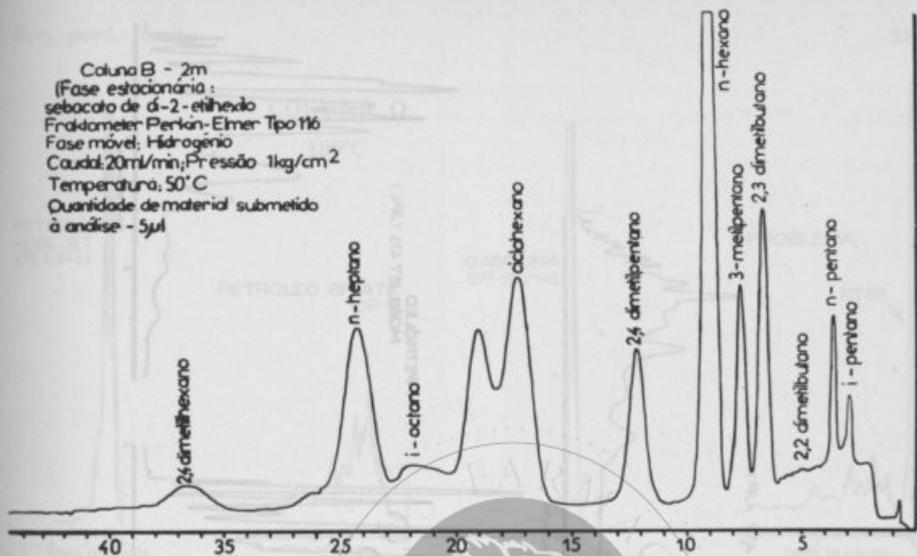
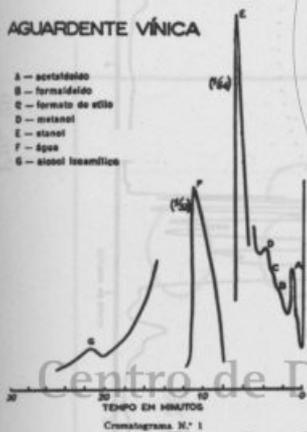


FIG. 18

AGUARDENTE VINHA

- A - acetaldéido
- B - formaldeído
- C - formiato de etilo
- D - metanol
- E - etanol
- F - água
- G - álcool isomérico



AGUARDENTE BAGACEIRA

- A - acetaldéido
- B - formaldeído
- C - formiato de etilo
- D - metanol
- E - etanol
- F - água
- G - álcool isomérico

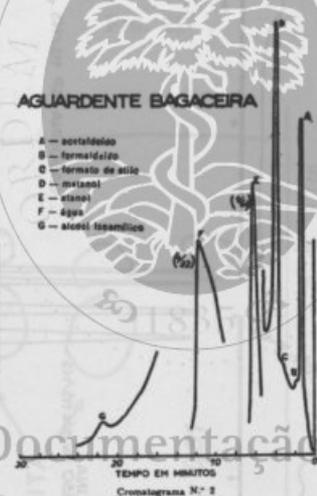
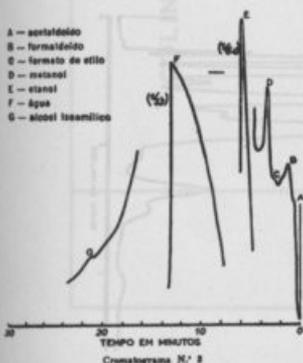


FIG. 19

AGUARDENTE DE FIGO

- A - acetaldéido
- B - formaldeído
- C - formiato de etilo
- D - metanol
- E - etanol
- F - água
- G - álcool isomérico



AGUARDENTE DE MEDRONHO

- A - acetaldéido
- B - formaldeído
- C - formiato de etilo
- D - metanol
- E - etanol
- F - água
- G - álcool isomérico



COLUNA O

153°C

278

PETRÓLEO BP, ATK (JP1)

PETRÓLEO SHELL ATF (JP1)

GASOLINA SHELL 100/130

GASOLINA ESSO AV gds 115/145

GASOLINA BP 115/145

PETRÓLEO MOBILJET 476 (JP4)

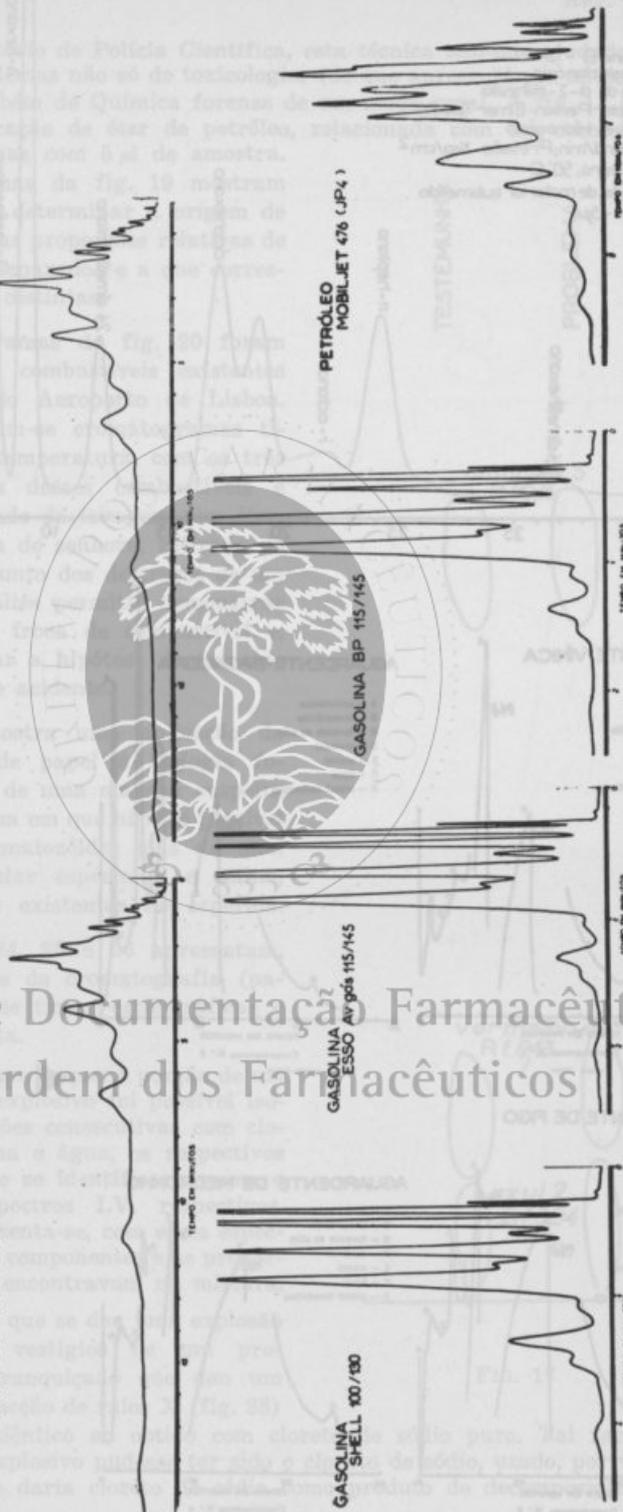


FIG. 20

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

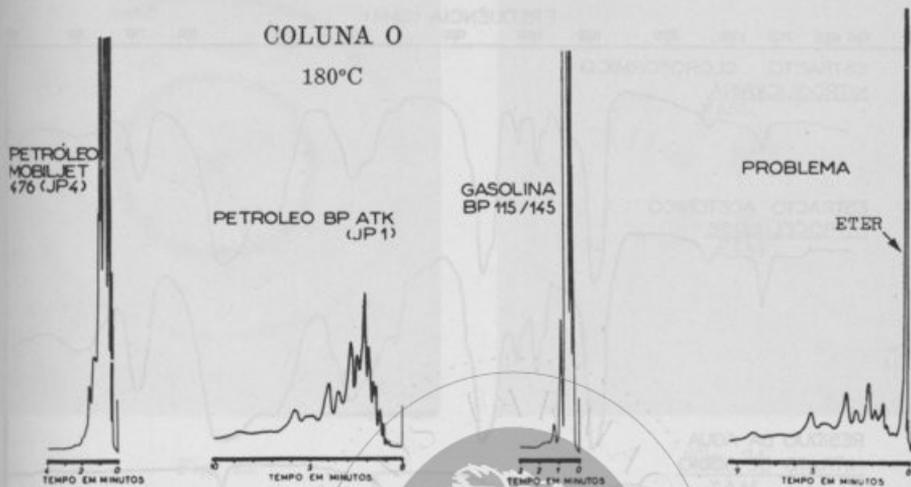
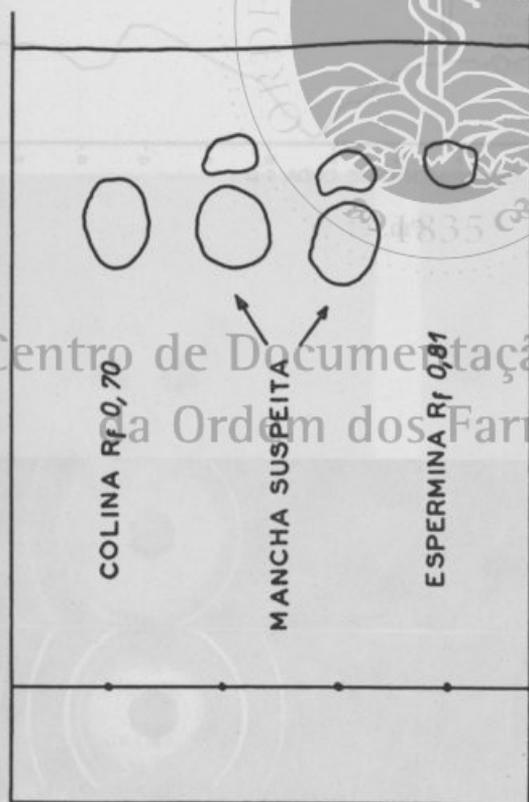


FIG. 21



**SISTEMA:**

*isopropanol,  
ácido acético,  
água (5:1:4)*

**REVELADOR:**

*Thiess e Reuter*

**BIB.:**

*J. Forensic Sci.  
5 (1960)*

FIG. 22

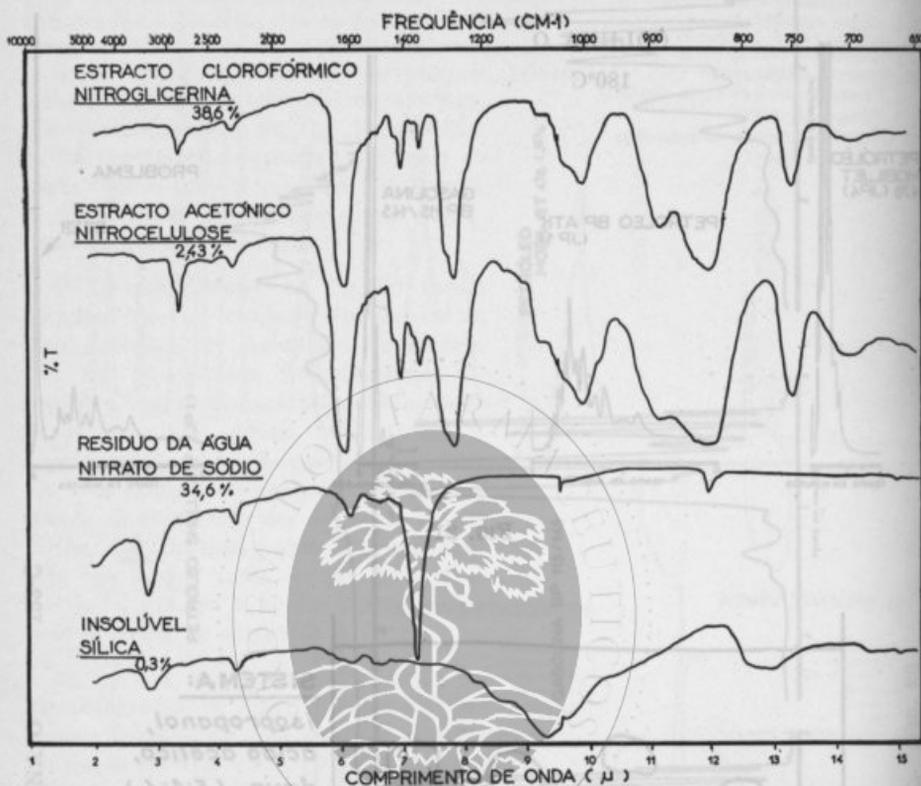


FIG. 27

## Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

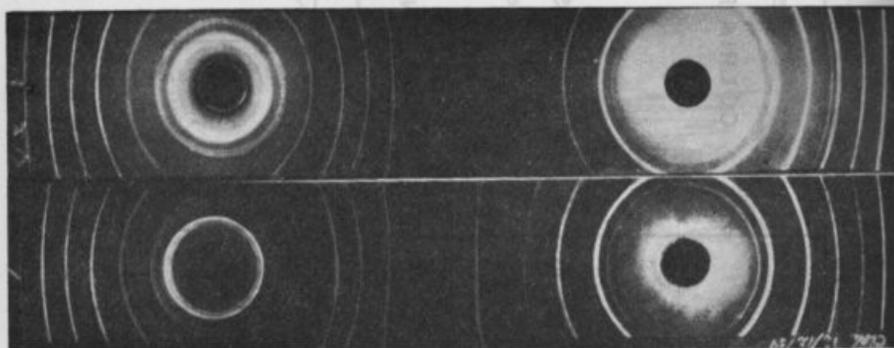


FIG. 28

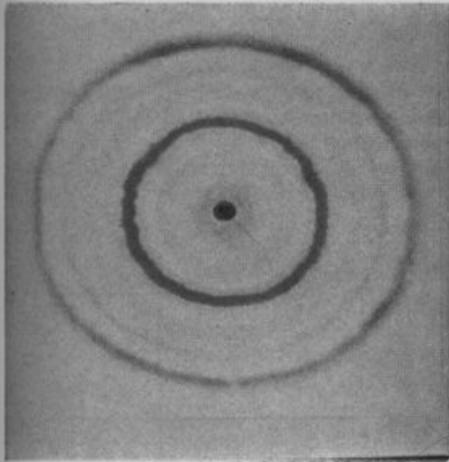


Fig. 23

CROMATOGRAMA CIRCULAR  
Tinta Pelikan permanente  
negro-brilhante

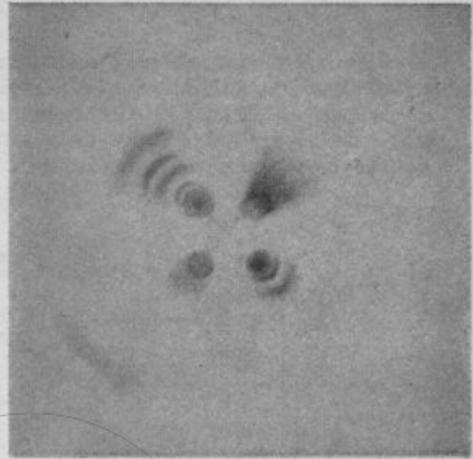


Fig. 24

CROMATOGRAMA RADIAL  
De cima para baixo e da esquerda  
para a direita:

- Skrip permanente azul negro
- Super Crome (verde)
- Waterman azul lavável
- Quink permanente azul

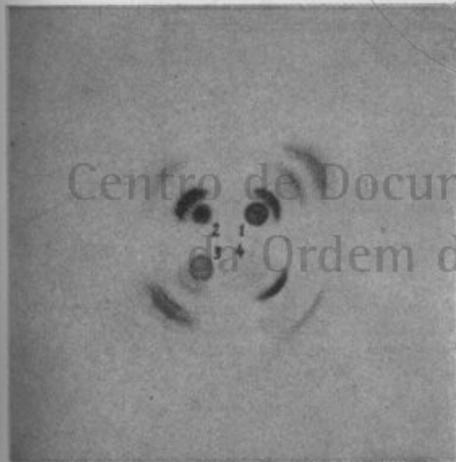


Fig. 25

CROMATOGRAMA RADIAL

- 1— Pelikan permanente negro
- 2— Quink permanente negro
- 3— Skrip permanente negro
- 4— Skrip castanho lavável

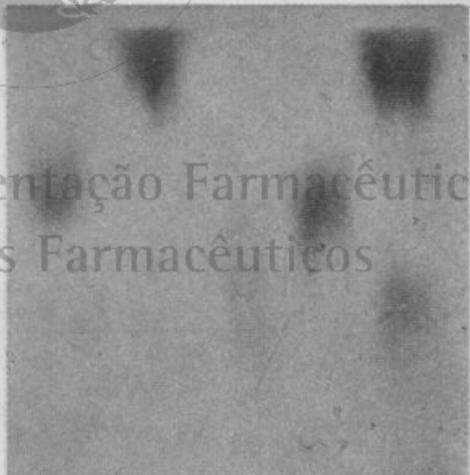


Fig. 26

CROMATOGRAMA ASCENDENTE

- Da esquerda para a direita:
- Lápis de tinta Faber N.º 9614, 9101,  
9609, 9611, 9100



Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos



Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

Noutra ocasião pediram-nos que informássemos qual de duas velas, referenciadas com os n.º 1 e 2, produzira os vestígios (gotas solidificadas), assinalados com os n.º 3 a 6, e retirados de um determinado local. Na fig. 29, apresentam-se os espectros IV tirados com os pingos de vela e as velas, antes referidos, e com parafina e estearina pura. A comparação dos primeiros espectros com os dois

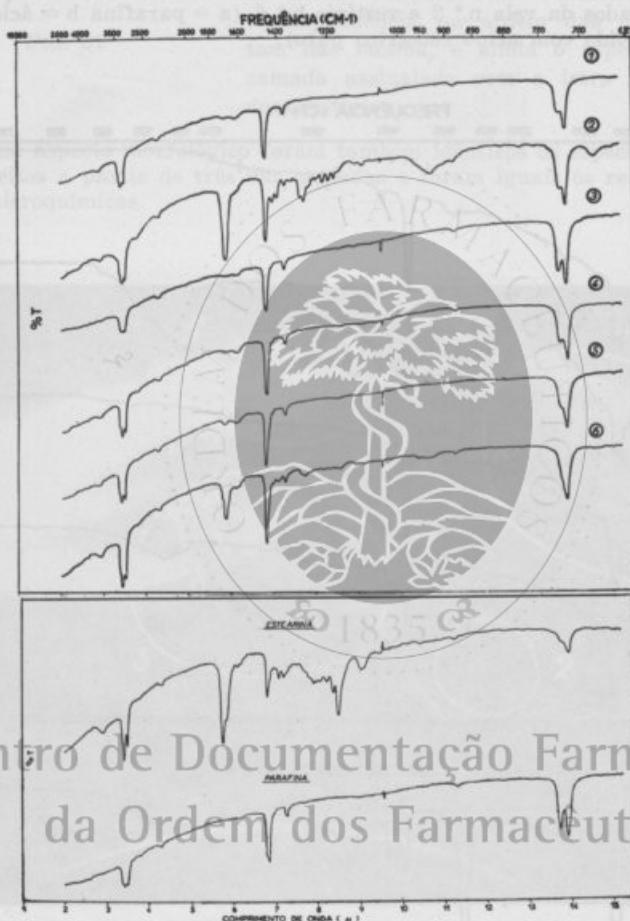


FIG. 29

últimos permitiu verificar que a vela n.º 1 e os vestígios 3 a 5 eram constituídos por parafina, enquanto que levou a admitir que a vela n.º 2 e o vestígio n.º 6 fossem formados por uma mistura de estearina e de parafina (Notem-se as proporções das bandas a cerca de  $6\mu$  = carbonilo e de  $7\mu$  = grupos alquilo).

Com o fim de confirmar essa hipótese fez-se o isolamento da parafina e da estearina existentes nessa vela e vestígio. Para isso, saponificaram-se quantidades conhecidas dos produtos em estudo com soluto alcoólico de hidróxido de potássio.

Terminada a saponificação, evaporou-se o álcool, retomou-se o resíduo em água quente e extraiu-se a suspensão resultante, com éter. O resíduo obtido por evaporação do extracto etéreo continha a parafina. Seguidamente, a fase aquosa foi acidificada com ácido clorídrico (até virar o vermelho Congo) e extraída, de novo, com éter. O resíduo deste segundo extracto etéreo era formado pelo ácido esteárico obtido por saponificação da triestearina.

Na fig. 30 apresentam-se os espectros IV tirados com a parafina e com o ácido esteárico, isolados da vela n.º 2 e vestígio n.º 6 (a = parafina b = ácido esteárico, ao lado do obtido com ácido esteárico puro).

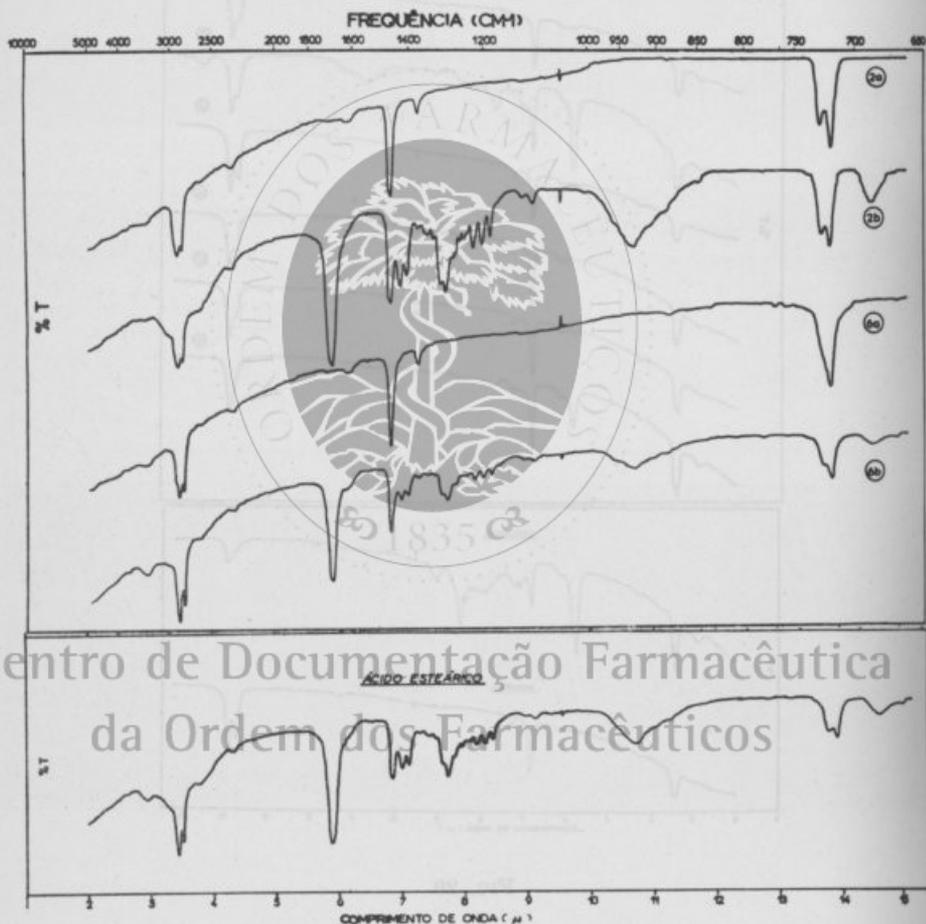


FIG. 30

Num local de um acidente de viação, com fuga do motorista, encontrou-se apenas um reduzido vestígio de tinta vermelha de automóvel (fig. 31). Mais tarde, recaíram suspeitas sobre um carro da mesma cor que, apresentava indícios de reparação recente. Do guarda-lamas consertado retiraram-se pequenas porções de tintas dos sítios assinalados na fig. 32.



FIG. 31

Fragmentos de tinta, retirados do local e colhidos no carro, para comparação, foram montados em plástico e polidos de modo a tornar possível o estudo morfológico. Na fig. 33 podem observar-se, muito ampliados, os cortes transversais respectivos que apresentam, em ambos os casos, onze camadas. Observou-se a perfeita correspondência na ordem das camadas, cor e tom das mesma, e ainda o aspecto sinuoso da camada assinalada com a letra *j* em qualquer dos vestígios.

Além do aspecto morfológico foram também idênticos os espectros de emissão e de IV, feitos a partir de três das camadas e foram iguais os resultados de dez reacções microquímicas.

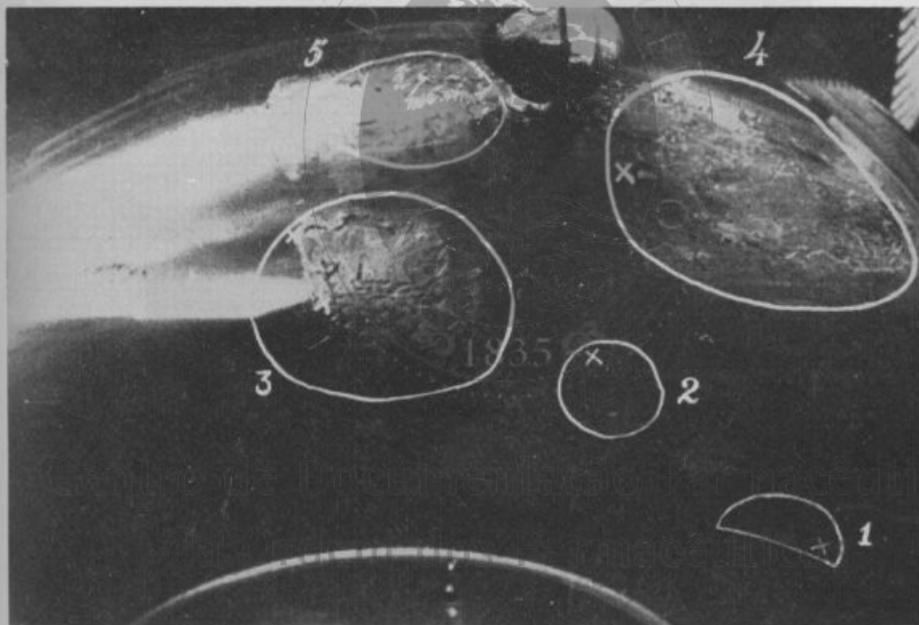


FIG. 32

Uma porta apareceu, certo dia, arrombada e com vestígios que levavam a admitir ter sido um «pé de cabra» o instrumento usado. Algum tempo depois, em casa de um indivíduo suspeito, encontrou-se um pé de cabra que apresentava restos de tinta verde (fig. 34), que era também a cor da tinta da porta que fora forçada. Como o arguido negasse terminantemente ter sido o autor, foi-nos enviado o pé de cabra suspeito e tinta da porta para comparação (fig. 35). Não só a cor verde era igual, «22 pi», segundo OSTWALD (20), como foram idênticos os resultados de reacções microquímicas efectuadas nas tintas em comparação.



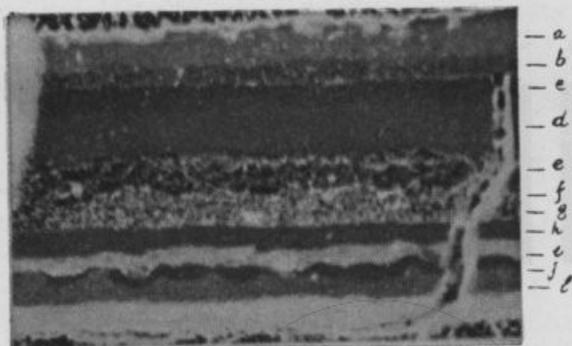
FIG. 34

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

FIG. 35



A análise espectrográfica — espectros de emissão (fig. 36) e de infravermelho (fig. 37) — confirmou a identidade das tintas submetidas a exame.



Corte transversal do vestígio encontrado no local  
(aumentado cerca de 100 x)



Corte transversal da tinta retirada do carro suspeito (4)  
(aumentado cerca de 100 x)

Fig. 33

Com os dados fornecidos, o autor realizou a análise instrumental da amostra e concluiu que se trata de uma tinta de origem portuguesa e correspondente a certos tipos de problemas de investigação. A análise instrumental realizada pelo autor, com a valiosa ajuda, que se refere a técnicas instrumentais, foi realizada no Instituto Politécnico de Coimbra.

Não quero terminar sem referir que a resolução dos problemas apresentados nos exemplos apresentados foi, em grande medida, devida aos meus colaboradores: D. Célia Esteves, A. Silva, António J. Matos, Mónica, ajudados directamente pelas Senhoras D. Maria I. Fernandes, D. Maria de Lourdes Juno, D. Maria Luísa Bionas, D. Maria Isabel Portugal de Silveira, D. Maria Isabel Costa e D. Maria Thalia Esteves.

Quero agradecer ao Director da Polícia Judiciária todo o estímulo e apoio que me tem dispensado e, ainda, a autorização que me deu para publicar este trabalho.

Cent

farmacêutica  
êuticos



Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

ANÁLISE QUALITATIVA DAS TINTAS POR ESPECTROGRAFIA DE EMISSÃO

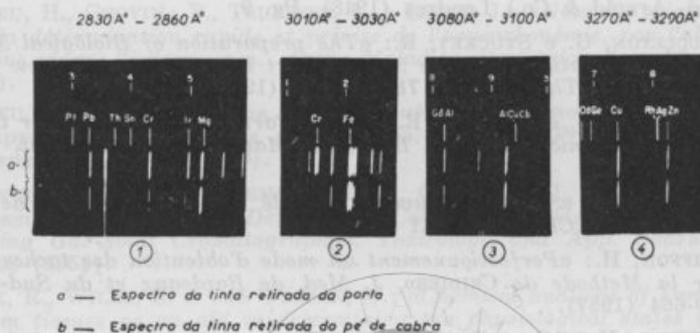


FIG. 36

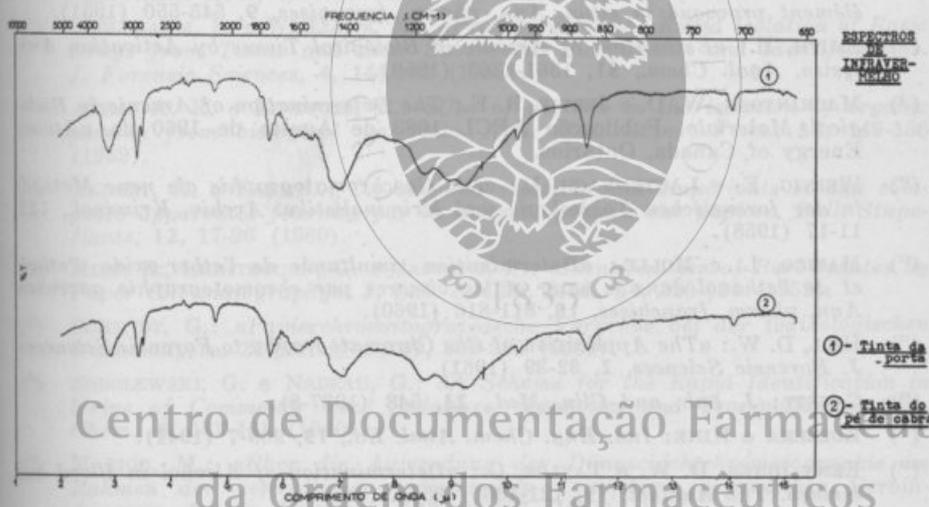


FIG. 37

Com os exemplos anteriores, escolhidos um pouco ao acaso, dentro de exames até agora realizados no Laboratório de Polícia Científica e correspondentes a diversos tipos de problemas, procuramos pôr em relevo a valiosa ajuda, que as modernas técnicas instrumentais vieram prestar ao químico forense.

Não quero terminar sem referir que a resolução dos problemas correspondentes aos exemplos apresentados foi, em grande medida, devida aos meus colaboradores D. Célia Esteves, A. Silva Santos e J. Matos Moreira, ajudados directamente pelas Senhoras D. Maria Leonor Fernandes, D. Maria de Lourdes Jana, D. Maria Luísa Bronze, D. Maria Isabel Portugal da Silveira, D. Maria Isabel Carita e D. Maria Emília Esteves.

Resta-nos agradecer ao Director da Polícia Judiciária todo o estímulo e apoio que nos tem dispensado e, ainda, a autorização que nos deu para publicar este trabalho.

## BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) LUCAS, A.: «Forensic Chemistry and Scientific Criminal Investigation». (Ed. Arnold & Co.) Londres (1948). Pg. 9.
- (<sup>2</sup>) MIDDLETON, G. e STUCKEY, R.: «The preparation of Biological Material for the Determination of Trace Metals. Part I—A critical Review of Existing Procedures». *The Analyst*, **78**, 532-541 (1953).
- (<sup>3</sup>) MIDDLETON, G. e STUCKEY, R.: «Idem. Part II—A Method for the Destruction of Organic Matter in Biological Materials». *The Analyst*, **79**, 138-142 (1954).
- (<sup>4</sup>) CRIBIER, I.: «Sur un nouveau procédé de détermination de l'arsenic». *J. Pharm. et Chem.*, **24**, 241 (1921).
- (<sup>5</sup>) GRIFFON, H.: «Perfectionnement au mode d'obtention des taches arsenicales par la Méthode de CRIBIER». *J. Med. de Bordeaux et du Sud-Ouest*, **134**, 659-664 (1957).
- (<sup>6</sup>) GRIFFON, H.: «Contribution à l'étude des intoxications arsenicales». *Ann. pharm. françaises*, **13** (1955).
- (<sup>7</sup>) GRIFFON, H. e BARBAUB, J.: «Méthode utilisable en Toxicologie pour la détection de l'arsenic dans les cheveux, par l'étude de la radioactivité de cet élément provoqué *in situ*». *Ann. pharm. françaises*, **9**, 545-550 (1951).
- (<sup>8</sup>) SMITH, H.: «Estimation of Arsenic in Biological Tissue by Activation Analysis». *Anal. Chem.*, **31**, 1361-1363 (1959).
- (<sup>9</sup>) MACKINTOSH, W. D. e JERVIS, R. E.: «The Determination of Arsenic in Biological Material». Publicação AECL 1083 de Agosto de 1960 da «Atomic Energy of Canada, Ontario».
- (<sup>10</sup>) WEINIG, E. e LAUTENBACH, L.: «Die Gaschromatographie als neue Methode in der forensischen Toxicologie und Kriminalistik». *Archiv. Kriminol.*, **122**, 11-17 (1958).
- (<sup>11</sup>) MARICQ, L. e MOLLE, L.: «Détermination simultanée de l'éther-oxyde d'éthyle et de l'éthanol dans le sang et les viscères par chromatographie gazeuse». *Ann. pharm. françaises*, **18**, 811-816 (1960).
- (<sup>12</sup>) HILL, D. W.: «The Application of Gas Chromatography to Forensic Sciences». *J. Forensic Sciences*, **2**, 32-39 (1961).
- (<sup>13</sup>) CAVETT, J.: *Lab. and Clin. Med.*, **23**, 543 (1937-8).
- (<sup>14</sup>) KOZELKA e HINE: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **13**, 905-7 (1941).
- (<sup>15</sup>) KENT-JONES, D. W. e TAYLOR, G.: «Determination of Alcohol in Blood and Urine». *The Analyst*, **79**, 121-136 (1954).
- (<sup>16</sup>) FRIEDMANN, T. e DUBOWSKI, K.: «Chemical Testing Procedures for the Determination of Ethyl Alcohol». *J. A. M. A.*, **170**, 111-133 (1959).
- (<sup>17</sup>) FELDSTEIN, M.: «Application of Infrared Spectrophotometry and Gas Liquid Chromatography to the Analysis of Volatile Substances». *J. Forensic Sciences*, **5**, 266-275 (1960).
- (<sup>18</sup>) CADMAN, W. J. e JOHNS, T.: «Application of the Gas Chromatography in the Laboratory of Criminalistics». *J. Forensic Sciences*, **5**, 369-385 (1960).
- (<sup>19</sup>) CHUNDELA, B. e JANÁK, J.: «Quantitative Determinations of Ethanol besides Other Volatile Substances in Blood and Other Body Liquids». *J. Forensic Med.*, **7**, 153-161 (1960).
- (<sup>20</sup>) MARICQ, L. e MOLLE, L.: «Quelques applications de la chromatographie gazeuse à l'analyse toxicologique». *J. Pharm. Belgique*, 405-414 (1960).
- (<sup>21</sup>) SALT, H.: «Microphotometric Determination of Carboxyhaemoglobin in Blood». *The Analyst*, **76**, 344-347 (1951).

- (<sup>21</sup>) KURZ, H. e WALLER, D.: «Die Genauigkeit der optischen Bestimmung von Kohlenoxyd-Hämoglobin im Blut». *Archiv. f. Toxikol*, **15**, 291-304 (1954-5).
- (<sup>22</sup>) FABRE, R., TRUHAUT, R. e BERROD, F.: «Une nouvelle méthode de dosage de l'oxyde de carbone dans le sang». *Ann. pharm. françaises*, **9**, 625-638 (1951).
- (<sup>23</sup>) MOUREU, H., CHOVIN; P., TRUFFERT, L. e LEBBE, J.: «Nouvelle microméthode pour la détermination rapide et précise de l'oxycarbonémie, par l'absorption sélective dans l'infrarouge». *Arch. Maladies Professionnelles*, **18**, 116-124 (1957).
- (<sup>24</sup>) MOUREU, H.: «Détermination de la pollution de l'atmosphère due au gaz d'échappement des véhicules automobiles». *Rev. An. Prev. de la Pollution Atmosphérique*, 31-39 (1960).
- (<sup>25</sup>) DOMINGUEZ, A. M., CHRISTENSEN, H. E., GOLDBAUM, L. e STEMBRIDGE, V.: «A sensitive Procedure for Determining Carbon Monoxide in Blood or Tissue Utilizing Gas-Solid Chromatography». *Toxicology and App. Pharmacol.*, **1**, 135-143 (1959).
- (<sup>26</sup>) CLARK, R., WILKS, S. e VAN FOSSAN, D.: «Chemical analysis of human post-mortem tissues as an aid in determining the physiological states of flying personnel prior to aircraft accidents». *Abs. of Comm. XXth Int. Phys. Congress. Bruxelles*, 1956.
- (<sup>27</sup>) KIRK, P. e BROWN, C.: «Improved Technique for Toxicological Extractions». *Mikrochim. Acta*, 714-719 (1957).
- (<sup>28</sup>) GOLDBAUM, L. e WILLIAMS, M.: «Procedure for the Rapid Isolation of Basic Drugs from Tissue and their Subsequent Purification and Identification». *J. Forensic Sciences*, **4**, 144-152 (1958).
- (<sup>29</sup>) ALHA, A. R. e LINDFORS, R.: «Use of acetone in the isolation of organic poisons from biological materials». *Ann. Med. Exper. Fenn.*, **37**, 149-156 (1959).
- (<sup>30</sup>) GENEST, K. e FARMILLO, C.: «Données relatives aux stupéfiants et aux composés apparentés fournies par la chromatographie sur papier». *Bull. Stupefiants*, **12**, 17-26 (1960).
- (<sup>31</sup>) HILF, R., LIGHTBOURN, G. e CASTANO, F.: «Identification of Barbiturates by Paper Chromatography». *J. Lab. & Clin. Med.*, **54**, 320-324 (1959).
- (<sup>32</sup>) SCHMIDT, G.: «Papierchromatographische Vorprobe bei der toxikologischen Harnanalyse». *Z. ger. Med.*, **49**, 259-280 (1959).
- (<sup>33</sup>) SOBOLEWSKI, G. e NADEAU, G.: «A Scheme for the Rapid Identification in Urine of Commonly Used Sedatives, Hypnotics and Tranquilizers». *Clin. Chem.*, **6**, 153-161 (1960).
- (<sup>34</sup>) MARIGO, M.: «Über die Anwendung der Dünnschichtchromatographie im Rahmen der gerichtlichen-medizinischen Toxikologie organischer Verbindungen». *Archiv. Kriminol.*, **128**, 99-107 (1961).
- (<sup>35</sup>) DAL CORTIVO L. A., WILLUMSEN C. H. e WEINBERG S. B.: «Separation of Toxicologically Important Bases via Centrifugally Accelerated Paper Chromatography». *Anal. Chem.*, **33**, 1218-1220 (1961).
- (<sup>36</sup>) WILLIAMS L. A., BRUSCOCK Y. M. e ZAK B.: «Rapid Electrophoresis of Alkaloids». *Anal. Chem.*, **32**, 1883-1885 (1960).
- (<sup>37</sup>) SCHMIDLIN-MÉSZÁROS J.: «Erfahrungen mit der Papierchromatographie bei toxikologischen Untersuchungen». *Chimia*, **12**, 255-261 (1958).
- (<sup>38</sup>) LEDERER E., LEDERER M.: «Chromatography». Elsevier, Amsterdam (1957).
- (<sup>39</sup>) JAMINET. FR.: «Séparation de quelques anesthésiques locaux par chromatographie de partage sur papier». *J. de Pharm. de Belgique*, **6**, 81-85 (1951).
- (<sup>40</sup>) POHLOUDEK-FABINI e KÖNIG K.: «Quantitative Bestimmung papierchromatographisch verteilter Sympathomimetica». *Die Pharmazie*, **15**, 61-70 (1960).
- (<sup>41</sup>) DEININGER R.: «Papierchromatographischer Nachweis der Barbitursäuren». *Arzn. Forsh*, **5**, 472-475 (1955).

- (43) CORMIER M., JOUAN P. e DANCOISNE G.: «*Separation de divers sulfamides par chromatographie et ionophorèse sur papier*». *Ann. pharm. franç.*, 15, 176-183 (1957).
- (44) ISBELL, R. A.: «*Spectrophotometry in Forensic Science*». *J. Forensic Science Soc.*, 2, 40-46 (1961).
- (45) BRADFORD, L. e J. BRACKETT, J.: «*Systematic Procedure for the Identification of Dangerous Drugs, Poisons, and Narcotics by U.V. Spectrophotometry*». *Mikrochimica Acta*, 353-382 (1958).
- (46) BRADFORD, L. e J. BRACKETT, J.: «*Report of Systematic U.V. Spectrophotometric Data of Dangerous Drugs, Poisons, and Narcotics*». Lab. of Criminalistics, San José, Califórnia.
- (47) WILLIAMS, L.: «*Drug Identification Using U.V. Spectrophotometry*». *J. Forensic Sciences*, 4, 492-498 (1959).
- (48) OESTREICHER, P. M., FARMILO, C. G. e LEVI, L.: «*Donnés tirées des spectres ultra-violets pour 90 stupéfiants et composés apparentés*». *Bull. Stupéfiants*, 6, 47-76, (1954).
- (49) ALHA, A. R. e TAMMINEN, V.: «*Infrared Spectroscopy in Forensic Chemical Identification*». *Ann. Med. Exper. Fenn.*, 37, 157-174 (1959).
- (50) LEVI, L., HUBLEY, C. e HINGE, R. A.: «*Spectre infra-rouge de certains stupéfiants et d'alcaloïdes apparentés*». *Bull. Stupéfiants*, 7, 44-102 (1955).
- (51) MANNING, J. e O'BRIEN, K.: «*Analyse des barbituriques par la methode de l'échantillon dans le disque de bromure comprimé et la spectrophotométrie infrarouge*». *Bull. Stupéfiants*, 10, 27-37 (1958).
- (52) CLEVERLEY, B.: «*Identification of Barbiturates from their Infra-red Spectra*». *The Analyst*, 85, 582-587 (1960).
- (53) BARNES, W. e SHEPPARD: «*Identification des stupéfiants par les méthodes physiques. Résultats de l'étude de la diffraction des rayons X par les poudres de 83 stupéfiants*». *Bull. Stupéfiants*, 6, 28-71 (1954).
- (54) PARSONS, J., BEHER, W. e BAKER, G.: «*Steroid X-Ray Diffraction Powder Data*». *Anal. Chem.*, 29, 761-766 (1957).
- (55) PENPRASE, W. e BILES, J.: «*The Use of Microscopic and X-ray Diffraction Methods for the Identification of Sedatives and Anticonvulsivants*». *J. Am. Pharm. Ass.*, 47, 523-528 (1958).
- (56) WILLIAMS, P.: «*Identification of Substituted Barbituric Acids by X-Ray Diffraction*». *Anal. Chem.*, 31, 140-143 (1959).
- (57) HERSHENSON, H. M.: «*Ultraviolet and Visible Absorption Spectra, Index for 1930-1954*». Academic Press, New York (1956).
- (58) KAMLET, M. e UNGNADE, H.: «*Organic Electronic Spectra Data 1946*», 2 vol. Interscience, New York (1960).
- (59) PIERSON, R., FLETCHER e GANTZ, C.: «*Catalog of Infrared Spectra for Qualitative Analysis of Gases*». *Anal. Chem.*, 28, 1218-1239 (1956).
- (60) HERSHENSON, H. M.: «*Infrared Absorption Spectra. Index for 1945-1957*». Academic Press, New York (1959).
- (61) ASTM. *Infrared and Ultraviolet Spectra*. ASTM.
- (62) DMS SPECTRAL Cards (*Documentation of Molecular Spectroscopy*) Verlag Chemie, Weinheim e Butterworths, London.
- (63) SADTLER: *Infra-Red Spectra and Ultra-Violet Spectra*; Sadtler, Philadelphia.
- (64) HANAWALT, J., RINN, H e FREVEL, L.: «*Chemical Analysis by X-Ray Diffraction. Classification and Use of X-Ray Diffraction Patterns*». *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 10, 457-512 (1938).
- (65) ASTM X-Ray Powder Data File». ASTMA, Philadelphia.

- (66) STETTbacher, A.: «Spreng- und Schiesstoffe Atomzerfallselemente, und ihre Entladungserscheinungen». Rascher Verlag, Zuriq (1948).
- (67) PRISTERA, F. e Col.: «Analysis of Explosives Using Infrared Spectroscopy». *Anal. Chem.*, **32**, 495-508 (1960).
- (68) MURPHY, E.: «Comparison of Methods for Detecting and Analyzing fumes from Explosives». US. RI, Bureau of Mines 5883 (1961).
- (69) HUMMEL, D.: «Kunststoff-, Lack- und Gummi-Analyse; Chemische und Infrarotspektroskopische Methoden». C. Hanser Verlag, Munique (1958) 2 vol.
- (70) MCGARVEY, J. W.: «Identification of Elastomers by Infrared Spectra of Their Pyrolyzates». Report Number 58-2159 Rock Island Arsenal, Illinois (1958).
- (71) COPIUS PEEREBOOM, J. W.: «The analysis of plasticizers by micro-adsorption chromatography». *J. Chromatog.*, **4**, 323-328 (1960).
- (72) OELKERS, W.: «Welches Kunststoff ist das?». Franckhs Werkstoff-Führer (1958) Stuttgart.
- (73) HARKINS, T. R., HARRIS, J. T. e SHREVE, O. D.: «Identification of pigments in paint products by infrared Spectroscopy». *Anal. Chem.*, **31**, 541-545 (1959).
- (74) FINCH, J., WILLIAMS, P. P.: «Identification of glass fragments by their physical properties». *The Analyst*, **83**, 698-699 (1958).
- (75) SCHLOSSMACHER, K.: «Edelsteine und Perlen». E. Schweizerbart'sche Verlag, Stuttgart (1959).
- (76) CHUDOBA e GÜBELIN: «Echt oder synthetisch?». Rühle-Diebener-Verlag-Stuttgart (1956).
- (77) BÖRNER, R.: «Welches Stein ist das?». Franckh'sche Verlag, Stuttgart (1958).
- (78) FINN, J. e CORNISH, R.: «Determination of Age of Inks by the Chloride Method». *Ind. Eng. Chem.*, **10**, 524-525 (1938).
- (79) BAILEY, C. F. e CASEY, R. S.: «Spectrophotometric Evaluation of the Color of Ink Marks on Papers». *Anal. Chem.*, **19**, 1020-1022 (1947).
- (80) BEHRENS, R.: *Papier unter der Lupe*. V. H. Osterwald, Hannover (1952).
- (81) KEIM, K.: «Das Papier». Otto Biersch Verlag, Stuttgart (1956).
- (82) KOTTE, H.: «Welches Papier ist das?». Franckhs Verlag (1959).
- (83) MARTIN, E.: «L'analyse du papier». *Rev. Intern. Pol. Criminelle* (1959).
- (84) MARTIN, E.: «Identification des encres de stylos à bille». *Rev. Intern. Pol. Criminelle*, 360-365 (1958).
- (85) CROWN, D. A., CONWAY, J. V. P. e KIRK, P. L.: «Differentiation of blue ballpoint pen inks». *J. Criminal Law, Criminol. & Police Science*, **52**, 338-343 (1961).
- (86) COOK, J. W.: «Paper chromatography of some organic phosphate insecticides». *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, **37**, 984-987 e 987-989 (1954).
- (87) MITCHELL, L.: «The separation and identification of chlorinated organic pesticides by paper chromatography». IV. *J. Ass. Off. Chem.*, **37**, 996 (1954).
- (88) MITCHELL, L. e PATTERSON, W.: «The separation and identification of chlorinated organic pesticides by paper chromatography» II e III. *J. Ass. Off. Chem.*, **36**, 553 e 1183 (1953).
- (89) OSTWALD: «Die Kleine Farbmestafel». Ausgabe C.

## O FARMACÊUTICO E A NECESSIDADE DA SUA CRESCENTE INTERVENÇÃO NA LUTA CONTRA OS INSECTOS

A. A. PALLA CARREIRO  
Capitão-Farmacêutico

Quando fui convidado a fazer uma palestra sobre pesticidas, mais precisamente sobre insecticidas, não tinha, pelo inesperado do convite, uma ideia precisa sobre os aspectos que mais conviria focar num tema de tão vastas possibilidades.

Hesitei entre um estudo criterioso, esclarecedor de algum dos muitos problemas que nos interessam mais de perto, tais como caracterização e doseamento, ensaios biológicos, ensaios de toxicidade e ensaios farmacológicos de compostos insecticidas, e uma dissertação simples e generalizada, que fizesse ressaltar o interesse que este importante grupo de substâncias tem para nós, e, inversamente, o muito que se pode esperar dos farmacêuticos como contribuição para o debelamento das pragas.

Optámos por esta última modalidade, esperançados que assim iríamos mais de encontro ao espírito que presidiu às presentes jornadas, em tão boa hora realizadas.

Uma observação atenta das cadeiras que constituem o curso de farmácia mostra bem como muitos dos complexos aspectos que envolvem o «contrôle» dos insectos se adaptam perfeitamente às características especiais da formação técnica dos farmacêuticos: os seus conhecimentos de química, permitindo desenvolver um trabalho de investigação sistemática no sentido de descobrir novos tóxicos ou melhorar a eficácia dos já conhecidos; a sua formação toxicológica incitando-o a abordar o importante problema da toxicidade dos insecticidas para o homem e animais domésticos; a sua preparação e prática de ensaios biológicos, facultando-lhe a possibilidade de criação e execução de técnicas capazes de elucidar «in vivo» não só o interesse prático e real dos insecticidas, como o desenvolvimento de linhas de insectos resistentes; os seus conhecimentos de formulação e de técnica galénica, dando-lhe condições para a direcção técnica de empresas fabricantes de preparados insecticidas, e, finalmente, a sua posição dentro do comércio de produtos químicos abrindo-lhes as portas à divulgação e venda de especialidades destruidoras de insectos.

### *O que é o insecto como peste?*

No «Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act» de 1947, designa-se por insecto qualquer representante de um grupo numeroso de pequenos invertebrados, possuidores geralmente de um corpo mais ou menos segmentado, a maior parte pertencente à classe «insecta», compreendendo indivíduos de 6 pernas, usualmente de formas aladas, como escaravelhos, percevejos, abelhas, moscas, e ainda outras classes de artrópodos, cujos membros não têm asas e normalmente têm mais de 6 pernas, como aranhas, traças, carrapatos, centopeias e bichos-de-conta.

Os insectos constituem um grupo de animais impressionante, capaz de influenciar extraordinariamente o estado sanitário da humanidade, quer ocasionando-lhe doenças, reduzindo-lhe os meios de subsistência ou incomodando-a sem piedade, quer, inversamente, prestar-lhe bons serviços, aliando-se a ela na luta contra terceiros, concorrendo para a polonização das plantas ou mesmo fornecendo-lhe alimento, como é o caso das abelhas, ou fornecendo-lhe vestuário, como acontece com o bicho-da-seda.

Ao apelar de impressionante a classe dos insectos não exageramos de modo nenhum. Dificilmente o valor dos algarismos pode tomar tanto peso como quando aplicado a diversos aspectos da vida dos insectos.

O número das suas espécies conhecidas é enorme: atinge cerca de 800 000, ou seja % de todos os animais (os mamíferos não contam mais de 10 000). Todos os anos são descritas 7000 espécies novas e segundo certos especialistas pode avaliar-se em 4 a 5 milhões o número de espécies existentes.

O número de indivíduos, independentemente das espécies, não é menos impressionante. Podem existir 500 000 formigas em certos formigueiros e numa área relativamente pequena não é difícil encontrar uma população de formigas superior à população humana de toda a China. Uma termita fêmea põe 36 000 ovos por dia e um simples piolho de couve, tendo alimentação suficiente, poderia vir a ter, numa só estação, uma descendência de peso igual a 822 000 000 000 de toneladas, considerando 1 mg como peso médio de cada indivíduo. Uma mosca doméstica na latitude de Whashington, depois de ter passado o inverno, pode dar origem a uma descendência entre 5 598 000 a 720 000 000 indivíduos, no espaço de 4 a 5 meses. De 1 m<sup>2</sup> de solo de uma floresta com 4 cm de espessura é possível recolher 2 300 000 artrópodos, dos quais 1 500 000 ácaros e 800 000 insectos (classe «insecta»).

A distribuição destes animais e a sua excepcional faculdade de adaptação são também notáveis. Encontramo-los em todos os locais, desde o deserto mais árido, às montanhas mais elevadas, como o Himalaia, a mais de 4000 m de altitude; no solo e, mesmo na atmosfera, como o verificou BERLAND, ao apontar a sua existência num Plancton aéreo a mais de 5000 m de altura; nas águas doces e nos lagos salgados, como certo lago vizinho do mar Cáspio onde as larvas suportam uma salinidade de 28,5 g/l. Existe mesmo um díptero que vive à entrada dos poços de petróleo, desenvolvendo-se a larva nesse poderoso insecticida!

Normalmente as espécies mantêm-se em número moderado, variando o seu número, de estação para estação, e, de local para local, de acordo com os factores ecológicos, nomeadamente temperatura e humidade. Só em condições anormais é que, certos insectos, podem vir a constituir epidemias de consequências económicas mais ou menos graves. Existe, por assim dizer, um equilíbrio entre o potencial biológico do animal e a resistência do ambiente, equilíbrio biológico este que pode ser perturbado, num ou noutro sentido, e assim dar lugar a que uma determinada espécie se torne mais rara ou muito mais abundante. Em certos casos essa abundância pode ser extraordinária, bastando lembrar uma nuvem de gafanhotos capaz de encobrir o sol — uma das 7 pragas do Egipto — para ter uma ideia da sua importância.

Chamo a atenção para estes números para vos dar o verdadeiro significado que essa população imensa, dotada de tão notável poder de adaptação, capacidade de resistência e possibilidade de reprodução, pode ter, em competição directa com o homem, e o interesse que ela deve despertar a uma sociedade progressiva.

Tendo em conta o crescimento rápido da população humana, é essencial que a produção de matérias alimentares se verifique num ritmo intenso pois que uma grande parte da humanidade encontra-se, hoje em dia, sub-alimentada. Esta produção é em parte diminuída por perdas consideráveis das colheitas mundiais, atribuindo-se 10 % dessas perdas, a parasitas e doenças das plantas, a maior parte das quais devidas a insectos.

Por outro lado é necessário desembaraçar a humanidade de flagelos tão graves como o paludismo ou a doença do sono que impedem o desenvolvimento de numerosos países e regiões.

São estes com efeito os dois aspectos nocivos sobre os quais mais nos devem ocupar os insectos e justificativos de um combate organizado e metódico.

Como inimigos dos vegetais, a sua capacidade potencial é alarmante, nomeadamente desde que o quadro antigo, com fraca densidade de plantas cultivadas,

e renovação frequente das culturas, foi substituído pelo quadro moderno de monocultura e selecção de variedades uniformes.

A Doriforo é um exemplo típico. Acantonado primitivamente sobre o *solanum rostratum*, que se desenvolvia no estado selvagem no oeste dos Estados Unidos, estendeu-se rapidamente a todos os países, proliferando nos campos de batata e provocando danos apreciáveis.

No dizer de MARIATT, presidente do Bureau Federal de Horticultura dos E. U. A., «o valor dos prejuízos causados às culturas e aos frutos por estes inimigos eleva-se a mais de 1 milhão de dólares por ano.

Mas é no seu aspecto de intermediário no transporte de agentes capazes de causar doenças nos seres humanos — doenças estas de que demos uma extensa lista num artigo publicado em 1953 na «Revista de Medicina Militar» — que os insectos despertam maior interesse quando examinados de um ponto de vista exclusivamente médico-farmacêutico.

O paludismo, devido a um protozoário, é transmitido pela picada do anófeles e causa cada ano a morte de 3 milhões de doentes; estatísticas recentes indicam que 600 milhões de palúdicos encontram-se atingidos de forma crónica. Ainda há bem pouco tempo se considerava que o número de mortes apenas na União Indiana atingia a cifra anual de 2 000 000 de indivíduos. A febre amarela propagada pela *Stenomya fasciata* matou milhares de pessoas em Barcelona e em Lisboa no século passado.

Em certas aldeias do Congo, Nigéria e Rodésia,  $\frac{2}{3}$  da população desapareceu pela incidência da doença do sono. Paralelamente, os animais domésticos morrem aos milhares atingidos por uma doença vizinha: a nagana.

Apesar disso, porém, não existe, no momento, qualquer organismo científico nacional que se dedique especialmente ao estudo da entomofauna em Portugal ou aos processos de evitar as suas nefastas consequências.

Existem é certo estudos realizados por entomologistas nacionais, mas estes são particulares ou foram feitos nos museus zoológicos ou nos laboratórios de Patologia Vegetal e de Biologia Florestal, ou nas Faculdades de Medicina, Instituto de Medicina Tropical e Escola Superior de Medicina Veterinária.

Actualmente, está em projecto um laboratório de Fito-farmacologia, a montar pela Direcção Geral dos Serviços Agrícolas, cuja finalidade, conforme fomos informados, será a de se dedicar apenas ao estudo dos problemas relativos à investigação, assistência técnica e ao fomento dos pesticidas, tendo em vista a defesa sanitária não só das culturas como dos produtos armazenados.

No que se refere a entomologia económica julgamos que pouco mais se tem feito do que o que se refere ao trabalho realizado pelo Instituto Superior de Agronomia.

Finalmente, sob o ponto de vista de legislação, o que existe resume-se praticamente a uma portaria — a portaria 17 980 de 30 de Setembro de 1960 — apesar de, no ano passado, o comércio de insecticidas ter já movimentado em Portugal uma soma de 500 milhões de escudos. Nessa portaria, justifica-se a publicação da mesma do seguinte modo: «Nestas condições, e enquanto não fôr publicado um diploma que regulamente de forma definitiva os serviços fiscais de importação, fabrico, preparação e venda de pesticidas e produtos correlativos, impõe-se estabelecer um conjunto de normas a que obedeça a respectiva actividade económica».

Trata-se, pois, de um diploma visando exclusivamente a actividade económica dos pesticidas, o que sem dúvida já era alguma coisa.

Acontece, porém, que, não só ainda não foi publicado o decreto anunciado, como além disso, segundo nos consta, não foi dado cumprimento ao que na portaria se estabelece, o que quer dizer que tudo continua a processar-se como dantes, sem qualquer espécie de fiscalização.

Pròpriamente no que se refere a uma actividade farmacêutica organizada, no nosso País, quer official quer particular, tanto no campo de investigação como no do «contrôle» das pragas, nada conhecemos, salvo o que modestamente temos procurado realizar no Exército. Na verdade, foi em 1952, quando ao tempo era director o sr. Tenente Coronel Farmacêutico Homero Ferreira, que se lançaram as bases de uma secção especializada para luta organizada contra os insectos nocivos, no âmbito militar. Tal actividade, que primitivamente se pensou poder abranger ensaios biológicos das espécies que mais interessam às Forças Armadas, tendo em conta a vastidão do nosso território, tem-se limitado apenas, por razões alheias à nossa vontade, à aplicação, manipulação e fabrico industrial de especialidades insecticidas.

A ideia de lutar contra os insectos não é recente e foi nomeadamente a corrida pelas substâncias que primeiro fez despertar o homem do seu alheamento quando se deu conta da interferência que os insectos podiam ter nos seus interesses vitais, como resultado da analogia dos respectivos alimentos.

Embora, porém, a aplicação das substâncias tóxicas seja muito antiga, pode considerar-se que foi em 1865 que a sua utilização agrícola começou a adquirir real importância. Nesta época, os agricultores do oeste dos Estados Unidos, cujas culturas de batata estavam a ser destruídas pela *Dorifora*, encontraram um meio de protecção eficaz com a utilização dum composto arsenical: o aceto-arseniato de cobre.

A partir desta data, o campo de aplicação das substâncias tóxicas, na protecção de culturas, foi-se alargando, nomeadamente quando, com o desenvolvimento da síntese orgânica, o número de produtos utilizados deu um salto brusco. Actualmente pode afirmar-se que na composição de especialidades pesticidas, fabricadas industrialmente, entram algumas centenas de substâncias.

Os insecticidas podem classificar-se de diferente modo consoante o critério adoptado: se o critério é o do estado físico, podem dividir-se em insecticidas líquidos, sólidos e gasosos; se é o da origem, em vegetais e, químicos ou não orgânicos; se é o do modo de penetração no organismo dos insectos, em insecticidas de contacto, de ingestão ou estomacais, e, gasosos ou fumígenos.

De todas estas classificações a que, para nós, é mais prática, para efeitos de exposição, é esta última.

Os insecticidas de contacto são os que atravessam a cutícula, como o DDT; os insecticidas estomacais ou de ingestão, são os que são absorvidos pelos insectos trituradores e penetram neles através do epitélio intestinal, como acontece com os compostos arsenicais, e os insecticidas gasosos ou fumígenos são os que actuam ao nível das vias respiratórias, como o ácido cianídrico.

Os insecticidas de contacto têm a particularidade de serem muito tóxicos para os insectos e muito pouco para os vertebrados. Este facto é facilmente explicável se se entrar em linha de conta que a estrutura da cutícula dos insectos constitui uma barreira frequentemente frágil contra a penetração de venenos, ao contrário da pele dos vertebrados que é muito mais difícil de franquear.

Numerosos ensaios mostram que os insecticidas atravessam tanto mais facilmente o tegumento dos insectos quanto mais elevada é a sua solubilidade nos lípidos. Por isso, o DDT, a nicotina, o piretro, o BHC e o DDVP têm uma acção mais rápida do que os arsenicais e os fluoretos, substâncias não lipossolúveis, dificilmente capazes de penetrarem na cutícula. Também o isómero  $\gamma$  do BHC, de solubilidade elevada nas gorduras, penetra no gorgulho do trigo, *Calandra granaria*, em quantidade 10 vezes maior que os isómeros  $\alpha$  e  $\beta$ , de solubilidade mais fraca.

Esta particularidade resulta evidentemente na natureza lipídica da camada cerosa da epicutícula.

Independentemente do insecticida empregado, ser ou não ser lipossolúvel, é interessante notar que a velocidade de entrada de uma molécula não dissociada

é mais rápida que a do ião correspondente. Assim, por exemplo, as larvas do mosquito *Culex* são mortas mais rapidamente pelo arseniato de sódio levado a um pH de 5, em que o ácido arsénico não está praticamente dissociado, do que a um pH de 2, em que ele está totalmente dissociado.

A epicutícula é também responsável pela retenção de água dada a sua natureza cerosa. Daí resulta poderem matar-se os insectos pulverizando-os com um pó inerte, tal como o carbonato de magnésio, que arrasta a cera por abrasão e promove a perda de água através da cutícula. Os insectos morrem rapidamente por dissecação. O *Rhodnius* que resiste normalmente à rotenona, sucumbe facilmente se se misturar um pó abrasivo. Assim, adicionando um composto de alumínio em pó ao trigo armazenado num silo, constata-se que os insectos mais activos, como o *Tribolium* e o *Sitophilus* perdem mais rapidamente a cutícula pela usura, do que qualquer espécie mais lenta, como o *Anobium*, que sobrevive por longos períodos.

No entanto, um insecticida de contacto não tem apenas que franquear a barreira epicuticular, mas também, a fase aquosa da endocutícula. Deve portanto ter uma solubilidade na água suficiente para que uma dose tóxica possa atravessar esta e penetrar na cavidade geral.

Daí, para ser eficaz, o insecticida dever ser miscível não somente com os corpos gordos e as ceras, mas também parcialmente com a água. Explica-se assim o papel importante dos detergentes que permitem obter pós molhantes pseudo-solúveis na água.

Muitos dos insecticidas usados hoje em dia dependem largamente de uma acção de contacto. Tal é o caso do piretro, rotenona, emulsões oleosas e nicotina, dos modernos insecticidas clorados tais como o DDT, BHC, clordano, dieldrin, endrin, etc., e, até mesmo dos derivados fosforados que, com excepção do DDVP, são especialmente conhecidos como venenos endoterápicos ou, como dizem os americanos, sistémicos.

O mecanismo de penetração dos insecticidas chamados de ingestão é, como o nome o indica, muito diferente. Trata-se muito simplesmente de venenos que são ingeridos simultaneamente com a alimentação e por isso estão particularmente indicados para os insectos que têm armadura bucal trituradora como a lagarta da couve.

A absorção do veneno faz-se evidentemente ao nível do intestino médio, onde as células epiteliais não se encontram recobertas por uma película protectora de quitina. Pode no entanto acontecer que certas grossas moléculas como a rotenona ou a fenotiazina atravessem o intestino sem serem absorvidos pois a isso o impeça a membrana peritrófica. O insecticida pode também ser destruído no tubo digestivo do insecto; é o que sucede com a larva de *Prædenia eridania* que hidrolisa o piretro no seu intestino médio em quantidade suficiente para o tornar inofensivo.

Citemos entre os insecticidas de ingestão, os arsenicais, os fluossilicatos, rotenona, diversos hidrocarbonetos clorados e os derivados fosforados, também já incluídos nos insecticidas de contacto.

O terceiro grupo de insecticidas deste critério de classificação, é constituído pelos insecticidas fumígenos que actuam por inalação. Usam-se geralmente em espaços fechados como casernas, celeiros, porões de navios, ou câmaras de expurgo, quando se aplicam na agricultura, e deles fazem parte os insecticidas gasosos como o ácido cianídrico, o sulfureto de carbono, a cloropricrina e o *p*-dicloro-benzeno.

Estes insecticidas penetrando no estado gasoso não tem senão uma parede de quitina muito fina a vencer: cerca de 0,01, a 0,02  $\mu$  na barata *Periplaneta americana*, por exemplo.

A resistência aos fumígenos varia com a idade do insecto: a larva é mais sensível que o adulto apesar da sua mais fraca intensidade respiratória. No *Tribo-*

lhum a ordem de susceptibilidade é a seguinte: ovo, larva, adulto, ninfa. A temperatura influencia também, a agressividade do tóxico. Muitos insectos são mais susceptíveis entre 10° e 30°C por a sua intensidade respiratória ser nessas condições elevada.

Por esta classificação dos insecticidas, podemos concluir que um insecticida para ser eficaz, tem de reunir duas qualidades: facilidade de penetração e ser capaz de ferir qualquer processo vital do organismo do insecto.

A maneira como o insecticida actua sobre os insectos de forma a perturbar profundamente as reacções vitais do metabolismo e a afectar a estrutura das células, implica um conhecimento profundo da fisiologia destes seres.

Dum modo geral, pode dizer-se que entre as lesões mais características, susceptíveis de serem criadas pelos diversos insecticidas, se podem considerar as seguintes:

- 1 — Acção sobre os leucócitos, fazendo variar o seu número e afectando a sua morfologia.
- 2 — Acção sobre as células do epitélio intestinal, constatando-se essencialmente a formação de vacúolos no citoplasma, lesões do núcleo e desapareção de membranas celulares.
- 3 — Acção sobre o protoplasma.
- 4 — Acção sobre os músculos.
- 5 — Acção sobre a respiração.
- 6 — Acção sobre o metabolismo dos glúcidos.
- 7 — Acção sobre a contracção muscular.
- 8 — Acção sobre o sistema nervoso.

Por tudo o que acabamos de dizer, verificamos não existir uma separação nítida entre os insecticidas utilizados na agricultura e os de interesse médico usados na protecção do homeem e animais domésticos.

No entanto, após exame das características dos diferentes tóxicos que fazem parte de cada um dos grupos de insecticidas atrás considerados, pode concluir-se que os venenos estomacais são específicos dos insectos fitófagos, enquanto os insecticidas de contacto, com relevo para os compostos clorados, são os mais indicados para lutar vantajosamente e com menor risco contra os insectos vectores de doenças.

Entre os tóxicos, especialmente estudados para o debelamento dos primeiros, isto é, dos insectos devoradores de culturas, os insecticidas endoterápicos ou teletóxicos constituem sem dúvida uma das maiores conquistas da ciência entomológica. Trata-se de tóxicos que, absorvidos e transformados pelos vegetais, transformam a sua seivã em veneno para os insectos picadores e trituradores.

Os principais insecticidas endoterápicos têm por base o fluor e sobretudo o fósforo. O grande passo neste sentido deve-se a SHNADER que descobriu os insecticidas fosforados num laboratório da I. G. Farben da Alemanha.

É interessante notar que existe uma grande semelhança entre os insecticidas fosforados e certos gases de combate, denominados «gases nervinos», como o tabum, o sarin, e o DFP. Todos derivam do ácido ortofosfórico ou do ácido pirofosfórico, todos têm uma actividade bioquímica comum, sendo poderosos inibidores da colinesterase, alguns em doses extremamente baixas.

Os insecticidas fosforados mais conhecidos são o Schradan (ou OMPA, ou Pestox), o dimeton, o Delmav, o HEPT, o malatião, o TEPP e o paratião, e representam um progresso interessante, pois evitam alguns dos numerosos inconve-

nientes dos insecticidas habitualmente usados. Convém, porém, que sejam utilizados com prudência, dada a sua elevada toxicidade, devendo procurar-se conhecer a sua acção sobre o homem, os animais domésticos e os vegetais.

A sua crescente utilização tem tornado, por isso, da maior acuidade o problema da sua identificação e doseamento nos produtos que servem de alimentação ao homem. Na verdade, é sempre de admitir que, depois de passarem directamente para os líquidos vegetais, não sejam completamente metabolizados, ou que, possam não ter sido definitivamente eliminados, apesar de uma abundante lavagem.

A legislação dos diversos países, adoptou procedimentos diferentes relativamente ao emprego destes pesticidas em agricultura. Em França, por exemplo, salvo raras excepções, encontra-se interdita a comestibilidade de alimentos que contenham mesmo apenas vestígios. Nos Estados Unidos e Rússia existe uma cuidada documentação indicativa da tolerabilidade dos produtos, acompanhada de minuciosas provas de toxicidade que são exigidas antes que um novo insecticida possa ser aprovado para um uso específico.

Como resultado destas exigências é extremamente abundante a literatura científica publicada em revistas da especialidade e mesmo em revistas farmacêuticas, sobre processos de doseamento e caracterização destes compostos, mesmo quando presentes em quantidades muito reduzidas.

Feita esta referência aos insecticidas endoterápicos, resta-nos agora considerar os insecticidas chamados de interesse médico que, como dissemos, são constituídos fundamentalmente por insecticidas clorados de contacto, especialmente de acção residual, embora os insecticidas gasosos ou fumígenos tenham tido apreciável aplicação na desinfectação de insectos nocivos.

O interesse pelos insecticidas residuais nasceu sobretudo com o aparecimento do DDT.

Introduzido durante a II Grande Guerra conjuntamente com a penicilina e o radar, o DDT foi abundantemente aplicado e mostrou possuir imensas possibilidades militares, mas os resultados da sua utilização manteve-se durante algum tempo pouco esclarecido.

Hoje não resta dúvida, e feita a história da guerra, a importância que ele teve na redução das perdas de efectivos militares. Sabe-se, com efeito, que a maioria das baixas nas guerras não se deve apenas directamente à acção do inimigo. Basta lembrar que, na I Grande Guerra, 25 % dos efectivos que entraram em campanha, pereceram do tifo, e que as perdas russas na mesma conflagração, por idêntico motivo, se calculam oficialmente em vários milhões.

Quando depois do armistício, em 1918, regressou à Europa um grande exército procedente de distritos palúdicos, a enfermidade propagou-se em forma epidémica por todo o sudeste da Europa, afectando em algumas zonas até 90 % dos seus habitantes.

Uma das grandes vitórias do DDT verificou-se exactamente na última conflagração em Nápoles, nos fins do ano de 1943. No mês de Dezembro deste ano eclodiu o tifo nos centros mais povoados, na maioria dos quais grassava a miséria, e onde pragas de piolhos minavam livremente. Foi então que os comandos aliados deram início a uma desinfectação em massa. Durante o mês de Janeiro de 1944, 1 300 000 cidadãos foram polvilhados em duas estações de despiohamento, à razão de 72 000 por dia e no prazo de três semanas a epidemia na cidade de Nápoles estava dominada. O número de baixas que semanalmente se registava entre o elemento civil passou de 305, na semana que finalizou em 11 de Janeiro, para 155 na semana seguinte.

Actualmente, o nosso Serviço de Saúde Militar em Angola luta com apreciável número de incidências de paludismo e disenteria, cuja origem não é difícil de adivinhar. Aliás, tal facto não é para admirar, se nos lembrarmos que, os americanos, apesar das suas grandes possibilidades, se queixavam de ter tido no

Extremo Oriente, um maior número de baixas devido a insectos do que ao inimigo, durante a luta que travaram com os japoneses na última conflagração mundial.

Dum modo geral, tanto o DDT como os outros insecticidas residuais que se lhe seguiram, são compostos orgânicos estáveis, que, quando aplicados sobre uma superfície permanecem tóxicos durante algum tempo, frequentemente diversos meses, para os insectos que pousem ou marchem sobre a referida superfície. As partículas destes insecticidas, tanto na forma cristalina como em solução oleosa, aderem aos pés dos insectos e dissolvem-se na camada exterior gordurosa da cutícula. Segue-se a penetração no insecto, desenvolvimento de lesões, nomeadamente sobre o sistema nervoso, conduzindo à paralisia e eventualmente à morte. A sua acção é relativamente lenta. Por vezes são necessários alguns minutos de contacto e o aparecimento da morte só se verifica passadas algumas horas. Deste modo não deve surpreender que um quarto tratado não apresente insectos mortos no seu interior, pois os insectos atingidos podem deixar o quarto e ir morrer no exterior.

Os insecticidas de contacto residuais mais usados em medicina preventiva, até ao presente, são os hidrocarbonetos clorados, dos quais se podem destacar três, pela sua mais frequente utilização e interesse médico:

- o DDT (dicloro-difenilo-tricloroetano) cujo *para-para* isómero é o mais activo.
- o Gama-BHC (isómero *gama de hexachloreto de benzeno*).
- a Dieldrin (hexacloro-epoxi-octahidro-dimetano-naftaleno), cujo *endo-exo* isómero é mais tóxico.

Dos insecticidas fosforados apenas um — descoberto recentemente — parece ter despertado apreciável interesse na luta contra os insectos vectores — o DDVP (0,0-Dimetil-2,2-diclorovinilfosfato), o qual, como o indica a sua nomenclatura, é, simultaneamente, um composto clorado. Este insecticida, descoberto ao mesmo tempo por químicos da CIBA, cientistas americanos e alemães, mostrou possuir características especiais, que o guindaram rapidamente a um lugar à parte entre os outros insecticidas já conhecidos. Na verdade é simultaneamente um insecticida de contacto extraordinariamente activo, mas ao contrário do DDT, dieldrin e, mesmo do BHC, é extremamente volátil, sendo por isso dotado de fraco poder residual. Costuma-se dizer a seu respeito que «aplicado sobre o chão as moscas morrem no tecto». A sua aplicação, não obedecendo, porém, às mesmas regras que devem orientar a utilização dos insecticidas de contacto, atrás referidos, permite no entanto obter excelentes resultados, quando se tira conveniente partido das suas características.

Entre os três citados insecticidas de contacto de acção residual existem pequenas diferenças de comportamento. O DDT e o dieldrin são ambos muito estáveis e persistentes, o primeiro mais lento no modo de actuar e menos tóxico para muitos insectos, que o último. Ambos são mais lentos a actuar e menos tóxicos que o BHC, que é, contudo, por sua vez, levemente volátil e por isso não tão persistente como os outros dois. Todos os três são, dentro de certos limites, irritantes para alguns insectos, como por exemplo, mosquitos e moscas, provocando abandono mais rápido, por parte deles, de uma superfície tratada, do que de uma não tratada.

Esta propriedade irritante é mais marcada no DDT, que frequentemente impele os insectos a deixarem a superfície tratada antes de se lhe ter adherido a dose letal de insecticida.

Todos estes compostos são sólidos e activos em quantidades pequenas. Por isso, para a sua eficiente aplicação é necessário utilizar um meio de dispersão.

A todos os três é comum a insolubilidade na água. O DDT, quando descoberto, foi frequentemente aplicado sob a forma de solução em petróleo, um solvente barato e de obtenção fácil. Mais tarde, e a fim de eliminar o custo do solvente,

começaram a ser fabricadas fórmulas que apenas requeriam a sua diluição em água, tais como concentrados para emulsão e pós dispersíveis.

A nós — como preparadores de preparações insecticidas e como encarregados do departamento de desinfestações — tem-nos interessado muito especialmente o estudo dos princípios que devem reger a aplicação prática dos insecticidas.

Resumimos a seguir algumas das constatações que a nossa experiência de alguns anos nos permitiu fazer.

1. Os insecticidas de acção residual devem aplicar-se sobre a superfície, onde os insectos pousam ou se deslocam, e não directamente sobre os insectos.

2. As soluções e emulsões só são eficazes quando aplicadas sobre superfícies relativamente não absorventes, tais como madeira, metal, superfícies pintadas, etc. Nesta superfícies as emulsões produzem habitualmente um efeito mais persistente do que as soluções, embora as últimas sejam por vezes preferidas por deixarem mais difficilmente vestígios da sua aplicação. Para superfícies muito absorventes, como paredes de terra batida, frequentes nas zonas tropicais, estão mais indicadas as formulações com pós humedecentes.

3. A velocidade de evaporação e consequente perda de toxicidade depende, não só da superfície onde o insecticida é aplicado, como também da natureza do solvente. A adição de óleos pesados pode travar a evaporação e portanto prolongar a toxicidade.

4. A toxicidade das partículas sólidas de insecticidas dependem do seu tamanho. Quanto mais pequenas forem as partículas mais facilmente estas aderem ao insecto.

5. Depois de aplicada uma emulsão ou uma suspensão sobre uma superfície dura, não absorvente, o agente humedecente, sendo dotado de uma natureza viscosa, tende a facilitar, uma vez evaporada a água, a aderência das partículas de insecticida à superfície, pelo que elas mais difficilmente aderem aos insectos que nela pousam.

6. Nas superfícies muito absorventes, embora a perda de potência seja menor com o uso de suspensão, a verdade é que, mesmo assim, se pode verificar uma perda apreciável de eficácia com o DDT e o dieldrin. Com o gama-BHC, ou muito mais ainda com o DDVP, nenhuma perda de eficácia se observa, pois, embora se possa verificar absorção, o insecticida pode continuar a matar por ser volátil.

7. Para que a aplicação do insecticida resulte é necessário que sobre as superfícies fique depositada uma quantidade uniforme adequada ou seja por decímetro quadrado, relativamente aos três insecticidas que estamos a considerar: DDT 20 mg, gama BHC 2 mg, dieldrin 5 mg. Com esse fim devem usar-se aparelhos com pulverizadores de abertura determinada, pois não é conveniente uma abertura nem muito grande nem muito pequena. Considera-se como boa uma abertura de 1/32" (1,23 mm) de diâmetro para as soluções e emulsões, e de 3/64" (1,84 mm) de diâmetro para as suspensões.

As preparações insecticidas devem ser formuladas de forma a permitir que o utilizador as aplique directamente ou, quando muito, que tenha apenas de proceder a uma simples mistura com um diluente, como a água por exemplo.

Por outro lado, a fim de se obter uma distribuição do tóxico uniforme é importante saber-se:

1.º — Qual o débito do jacto de líquido à saída do aparelho pulverizador. Um débito conveniente é o de 2,5 a 5 litros por 100 metros quadrados.

2.º — Qual a percentagem de insecticida puro na fórmula a aplicar. Por insecticida puro compreende-se o *para-para* isómero nas preparações de DDT, o isómero *gama* nas preparações de BCH e o isómero *endo-exo* num preparado de dieldrin.

Geralmente o DDT técnico comercial contém cerca de 80 % de isómero *para-para*, o BHC 13 % de isómero *gama* e a dieldrin comercial 85 % de *endo-exo* isómero.

Nas nossas desinfestações temos usado fórmulas de insecticidas cujas composições publicámos no artigo que atrás referimos. Mais recentemente, tivemos de pensar em enriquecer a nossa gama de trabalho, com preparações com base em dieldrin e DDVP nomeadamente para reduzir as possibilidades de resistência.

Como efeito, o aparecimento de linhas de insectos resistentes é bem conhecido desde que, durante a última guerra, se começou a fazer uso intensivo de insecticidas de síntese de acção residual.

Nos primeiros tempos os utilizadores culpavam frequentemente os fabricantes de lhes fornecerem produtos de má qualidade. Um estudo criterioso, porém, levado a cabo no laboratório, pôs em evidência que os insectos conseguiram adquirir uma resistência surpreendente, e por vezes paradoxal.

Constatou-se assim, por exemplo, que a espécie banal *Musca doméstica* se tornou insensível ao DDT em quase todo o globo. Em comparação, verificaram que as espécies vizinhas *Musca vicina* e *Musca nebulosa*, endémicas da ilha de Ceilão, são ainda sensíveis após quatro anos de tratamento intensivo com DDT.

A luta contra os mosquitos revela os mesmos fenómenos. Em 1950 conheciam-se treze espécies resistentes e em 1956 trinta e sete.

Durante a guerra da Coreia, observaram-se também resistências ao DDT nos piolhos do corpo, que atingiam 40 vezes, relativamente aos das linhas testemunhas.

É interessante notar que, muito frequentemente, raças resistentes aos insecticidas de síntese, não o são — ou apenas muito ligeiramente — para os insecticidas de origem vegetal, que, talvez, tudo leva a crer tivessem sido abandonados demasiado cedo.

Passámos em revisão rápida alguns aspectos relacionados com os insecticidas.

O nosso fim não foi o de tratar com profundidade qualquer aspecto particular, mas sim o de chamar a vossa atenção para o interesse que vêm tomando os insecticidas e abordar superficialmente alguns dos pontos mais importantes, esperançados em concorrer deste modo para um maior entusiasmo por parte da classe farmacêutica em colaborar na resolução dos diversos problemas, dado que, muitos são os campos em que os seus conhecimentos especiais e a sua actividade pode ser útil e deve ser encarada.

Quer nos grandes centros através de laboratórios analíticos ou de estabelecimentos produtores — onde até à data nem sequer o exame da 4.ª classe se exige por nada estar legislado sobre o assunto — quer nos centros urbanos como técnico consultor ou fornecedor, os farmacêuticos podem na verdade, desempenhar um inequívoco serviço a favor da comunidade.

Um aviso, porém, fica feito, o de não se deixarem influenciar com a simplicidade dos factos aqui apresentados. A realidade é bem mais complexa e a atestá-lo está a abundante literatura existente e o número de trabalhos contraditórios.

O filme que agora vamos ver, amavelmente cedido pela SHELL, é uma obra interessante — perfeito na técnica cinematográfica e eloquente na explanação do tema — que espero possa completar, por meio de imagens, a noção da ameaça que podem constituir para a humanidade os insectos e a necessidade que a todos compete, e muito especialmente a nós farmacêuticos, de colaborar nessa luta para um mundo melhor e mais saudável. Só assim será possível transformar regiões, hoje insalubres, em habitáveis, e perseguir que populações exterminadas por febres passem a viver num bem-estar até agora ignorado.

## O FARMACÊUTICO E A MICROSCOPIA ANALÍTICA

A. CORREIA ALVES

1.º Assistente da Faculdade de Farmácia do Porto

Apesar de o espírito inventivo do Homem e o enorme progresso científico registado nestas últimas décadas ter posto à disposição dos analistas as mais apuradas técnicas e as mais aperfeiçoados aparelhos que é possível imaginar-se, o microscópio continua a ser ainda um precioso instrumento analítico.

Não falando já nas análises microbiológicas, em que o microscópio é o instrumento imprescindível, pode dizer-se que a investigação microscópica é utilizada no exame de variadíssimas substâncias, entre as quais se contam os alimentos, as drogas vegetais, fibras, artigos de penso, tecidos, papel, e tantas outras.

Dado que o curso de Farmácia, além da sua função primordial de criar indivíduos cuja principal actividade é preparar medicamentos, possui características muito especiais, que concorrem para que os seus diplomados recebam uma preparação analítica que talvez nenhum outro curso universitário confira, parece-nos oportuno abordar o tema «O Farmacêutico e a Microscopia Analítica».

Vejamos, em primeiro lugar, algumas das principais aplicações da Microscopia Analítica, a fim de podermos, depois, discutir a competência do farmacêutico nesses diversos campos.

Ao tentarmos enunciar algumas das matérias que podem ser objecto de uma análise microscópica deixámos, propositadamente, de fora, as análises microbiológicas, que constituem parte integrante das Análises de Aplicação à Clínica, mas tal facto significa, apenas, que pretendemos abordar, exclusivamente, aquilo que poderemos denominar a Microscopia Analítica Geral.

Posto isto, comecemos por enumerar algumas das matérias que podem ser objecto de uma análise microscópica, no sentido que lhe atribuímos.

É evidente que será praticamente impossível dar uma lista dessas matérias, pois a versabilidade do microscópio é muito grande. Por isso apenas enumeramos aqui os capítulos da análise microscópica mais consagrados, sem esquecermos que muitos outros problemas poderão surgir ao analista, cuja resolução ele encontrará recorrendo ao uso do microscópio.

Assim, por exemplo, o analista pode ser chamado a fazer a identificação de sementes e frutos de pequenas dimensões, bem como a caracterização dos constituintes de misturas usadas na alimentação de animais, particularmente, de pássaros.

Igualmente na análise das águas, à parte a análise bacteriológica, também tem bastante importância a observação microscópica dos respectivos sedimentos. É grande, muito grande mesmo, a variedade de elementos de origem biológica que neles o analista pode encontrar e ter de identificar, desde as diatomáceas, passando pelas algas, fungos, flagelados e protozoárias, até aos vermes e insectos.

Por aqui se torna já evidente a necessidade de todos quantos pretendam tornar-se peritos no uso do microscópio, como instrumento analítico, possuírem um conhecimento bastante vasto dos vários campos das ciências biológicas.

Da maior importância, do ponto de vista da saúde pública, é o assunto referente à análise dos produtos alimentares. Tão importante é que hoje constitui uma ciência aplicada totalmente independente, denominada Bromatologia, cujo principal objectivo é não só o estudo da composição química dos alimentos, como, também, da fixação das suas normas de pureza.

Julgamos não andar longe da verdade ao afirmar que o capítulo mais importante da Bromatologia é o que diz respeito à análise dos produtos alimentares,

o qual constitui, sem dúvida, um dos mais importantes pilares sobre que assenta a defesa da saúde das massas populacionais de um país.

Para executar as suas análises o bromatologista utiliza todos os progressos que a técnica e a ciência puseram ao seu alcance, mas em muitos casos depende ainda, quase exclusivamente, do exame microscópico como único processo analítico capaz de resolver os seus problemas.

Basta citar alguns exemplos para demonstrar, concludentemente, o que acabámos de dizer. É o caso da análise das farinhas, as mais importantes das quais, do ponto de vista da panificação, são as de trigo, centeio e milho. Ora, a identidade destes produtos só jode ser correctamente estabelecida pelo seu exame microscópico, através do estudo dos grãos de amido.

Por causa das diferenças de preço, muitos indivíduos desonestos não hesitam em falsificar a farinha de trigo, adicionando-lhe outras, de cotação inferior. Tais falsificações escapariam facilmente aos rigores da lei se não houvesse possibilidade de as analisar microscopicamente, único processo que o analista tem para descobrir essas fraudes.

Mesmo quando a percentagem de farinha estranha adicionada a outra não ultrapassa os 5 %, o problema, apesar de bastante mais difícil, tem solução. Também a adição de farinha de cevada à de trigo pode ser posta em evidência, apesar da extraordinária semelhança morfológica dos grãos de amido destas duas espécies.

Neste caso pode-se não só verificar a presença de cevada, como calcular, ainda, a quantidade presente, bastando, para tanto, determinar a proporção de grãos de amido existentes na amostra cujas dimensões sejam iguais ou superiores a 40  $\mu$ . Mas uma análise deste género é do domínio da microscopia quantitativa, de que falaremos mais adiante.

Ainda restringindo-nos às farinhas, devemos recordar que a análise microscópica é uma dos processos utilizados para revelar ou confirmar a sua contaminação com a cravagem, capaz de originar envenenamentos em massa e às vezes de consequências bem trágicas. Também é a análise microscópica que pode indicar a presença de ácares nestes mesmos produtos.

Mas há mais exemplos da utilidade da microscopia na análise bromatológica. Assim, a falsificação do arroz pela adição de talco pode evidenciar-se pelo exame microscópico do sedimento obtido lavando-o com água, separando esta e deixando-a depositar.

Também as «jams» ou marmeladas de frutos, largamente utilizadas nalguns países europeus, são facilmente analisadas por esta técnica, a qual permite não só estabelecer a identidade dos produtos usados na sua confecção, como, ainda, verificar se tais marmeladas contêm polpa de maçã, a qual é revelada pela natureza especial das células do seu endocarpo, onde existem esclereidos comprimidos e lenhificados, dispostos de maneira característica.

Mas a lista ainda não está esgotada. Os molhos aperientes, tais como o conhecido «molho inglês», e tantos outros, podem ser satisfatoriamente analisados com o auxílio do microscópio, sendo possível identificar, pela natureza dos elementos celulares presentes, as diversas especiarias usadas na sua preparação, como o cápsico, as pimentas branca e preta, gengibre, cravinho, canela, noz moscada, etc., etc.

Graças aos grãos de pólen, a análise microscópica permite determinar a origem de um mel e rejeitar algumas qualidades, consideradas inferiores, como o «mel de eucalipto», proveniente da Austrália.

Também as conservas de peixes, inteiro ou em pasta, podem ser analisadas microscopicamente, e não raras vezes a identificação do produto depende, unicamente, do exame microscópico das escamas presentes.

O café, produto de alto valor económico, é frequentemente adulterado pela adição de chicória, e é ainda o exame microscópico que pode revelar a fraude,

pois estes dois produtos têm elementos celulares tão diferentes uns dos outros que a falsificação torna-se logo evidente.

Nalguns países, em que a indústria dos chocolates está altamente desenvolvida e em que se processam enormes quantidades de cacau, as cascas deste são aproveitadas como sub-produto, empregando-as, às vezes, na preparação de rações alimentares para o gado ou na confecção de biscoitos para cães.

Em Inglaterra, por exemplo, os animais de estimação são em grande número e por isso as fábricas de «pet-foods» prosperam. Acontece que se os alimentos a que nos acabámos de referir contêm estas cascas em quantidade exagerada podem tornar-se tóxicas, devido à presença de teobromina. Se bem que este alcalóide possa ser pesquisado por meios químicos, a adição de cascas das sementes de cacau a tais alimentos é facilmente revelada pelo respectivo exame microscópico.

Existem ainda, alguns produtos de origem mineral, importantes do ponto de vista industrial ou farmacêutico, cuja identidade pode ser reconhecida pela análise química, se bem que a sua natureza precisa apenas possa ser determinada pelo exame microscópico. É o caso, por exemplo, das variedades de enxôfre, de carbonato de cálcio e outras substâncias.

Assim, há pelo menos três variedades comerciais de enxôfre, todas de elevada pureza mas apresentando certas particularidades inerentes a cada uma, o que aconselha a não as usar indistintamente, e só o exame microscópico permite distingui-las.

O carbonato de cálcio apresenta-se sobre diversas variedades e, dentro destas, o carbonato de cálcio precipitado pode aparecer no mercado sob várias gradações, tais como «extra leve», «leve», «médio» e «pesado». Conforme o fim a que se destina, assim se deve utilizar uma ou outra gradação, e às vezes pode ser necessário determinar o carácter microcristalino ou amorfo de uma amostra, o que se consegue com rapidez e precisão recorrendo ao microscópio.

Certo número de substâncias de natureza siliciosa, geralmente usadas sob a forma de pó fino, podem ser comodamente analisadas microscópicamente.

Está neste caso o caulino, que, além dos seus usos industriais é empregue em Farmácia, quer na filtração, quer na preparação de pílulas, ou, ainda, como medicamento, em certas afecções do tubo digestivo.

Geralmente na filtração ou na indústria utiliza-se o produto constituído por partículas maiores, até  $50 \mu$ , tendo, em média,  $10 \mu$  de diâmetro, enquanto que a variedade de caulino medicinal é constituída por grânulos que raramente excedem os  $20 \mu$ , sendo as suas dimensões médias  $2 \mu$ .

A bentonite é um silicato que origina um gele em presença de água, motivo por que é usada em Farmácia como agente suspensor. Podendo confundir-se com o caulino, consegue-se distinguir estas substâncias graças a um ensaio microscópico simplíssimo. Para isso, basta colocar um pouco de produto numa lâmina seca e cobrir, depois, com uma lamela. Se fizermos agora correr uma gota de água entre a lâmina e a lamela, o líquido difundir-se-á livremente no caso da substância ser o caulino e as partículas deste mover-se-ão ao aplicarmos uma ligeira pressão sobre a lamela.

Tratando-se, porém, de bentonite, verificar-se-á não haver difusão da água, que é imediatamente retida por aquela na margem da lamela, originando um gele, e por isso também não se observará movimento das partículas após compressão da substância.

A diatomite ou kieselghur é constituída pela carapaça siliciosa de diatomáceas fósseis, sendo um produto utilizado para certas filtrações. Às vezes pode haver necessidade de pesquisar areia no kieselghur, o que se consegue com relativa facilidade. Basta observar um pouco da amostra suspeita montada em solução de hidrato de cloral e por causa das diferenças de índice de refração a diatomite é praticamente invisível, apenas se observando a areia, que se reconhece sem dificuldade.

Também alguns medicamentos officinaes ou industrializados podem ser convenientemente submetidos à análise microscópica para se determinar a sua natureza e a identidade de alguns dos seus constituintes.

Estão neste caso as pílulas e os comprimidos, sendo esta técnica utilizada para investigar os pós vegetais que entrem na sua composição, ou, ainda, para determinar a natureza dos lubrificantes, diluentes e outras substâncias usadas na fabricação dos comprimidos.

Vejamos agora o capítulo referente à análise microscópica das drogas de origem vegetal.

Como é do conhecimento de todos, as matérias-primas fornecidas pelo reino vegetal à terapêutica são em grande número e da mais alta importância. Muitas delas são directamente transformadas em formas medicamentosas, obtidas segundo os cânones que regem a Farmácia Galénica, ao passo que um contingente não menos numeroso é utilizado pela indústria química, que a partir delas prepara uma quantidade impressionante de utilísimos compostos empregados no tratamento de tantas e tantas doenças.

Qualquer que seja o seu modo de utilização, o certo é que as drogas vegetais representam hoje em dia algumas das matérias-primas mais importantes, attingindo as suas transacções nos mercados mundiais a cifra de muitos milhões de dólares anualmente.

Cada droga, como sabemos, é rigorosamente definida pela sua origem botânica e as diferentes Farmacopeias são muito exigentes a esse respeito, não permitindo, salvo raríssimas excepções, a substituição das drogas officinaes por outras fornecidas por espécies affins.

Por essa razão, de todas as ciências relacionadas com o estudo e a produção das drogas vegetais, a Farmacognosia é, de longe, a mais importante. Se bem que esta estude as drogas sobre múltiplos aspectos, desde a sua origem botânica, *habitat*, factores que condicionam a sua produção, morfologia e constituição química, é, antes de tudo e essencialmente, uma ciência devotada à investigação da morfologia das drogas, como muito bem acentua o Prof. Gösta Edman, de Estocolmo, nas palavras que escreveu no folheto de homenagem a um dos mais destacados morfologistas contemporâneos — o Dr. T. E. WALLIS, publicado na passagem do seu 85.º aniversário, por iniciativa da «*The Pharmaceutical Society of Great Britain*».

Por motivos facilmente compreensíveis, o valor das drogas depende da sua autenticidade, mas a sua caracterização, no entanto, é um problema delicado, pois na grande maioria dos casos estas são constituídas por partes de plantas ou por produtos por elas segregados.

Deste modo, faltando quase sempre os elementos imprescindíveis para se fazer uma classificação botânica correcta e assente em bases seguras, o farmacognosista, mesmo assim, tem que assegurar se uma droga é genuína ou não é. E como pode ele desempenhar uma tarefa tão melindrosa, mas tão necessária como importante, se é relativamente fácil, por exemplo, confundir umas cascas de determinada espécie com as provenientes de outras plantas, com propriedades às vezes totalmente diferentes? A resposta a esta interrogação é só uma: Estudando os caracteres morfológicos das drogas, quer macroscópicos, quer, principalmente, microscópicos.

Dado que existem várias espécies, às vezes próximas daquela que representa a fonte autêntica de determinada droga, que podem ser misturada com esta ocasional ou intencionalmente, o farmacognosista tem de conhecer não só os caracteres das drogas officinaes, como, também, os dos seus possíveis adulterantes. E é neste domínio que a microscopia analítica se reveste da maior importância.

Na realidade, os dados experimentais acumulados têm permitido verificar que se os caracteres morfológicos macroscópicos falham e são insuficientes para a caracterização de muitas drogas, o mesmo não acontece, felizmente, com os carac-

teres microscópicos, que em última instância, constituem o único meio seguro para a sua caracterização.

Aliás já há muito tempo que os farmacognosistas reconheceram esta verdade e a prova disso está no enorme volume de trabalho de investigação realizado sobre a microscopia das drogas e seus adulterantes, o qual constitui as bases sobre que assenta, actualmente, a identificação de muitas delas.

De facto, foi nos meados do século passado que os estudos microscópicos começaram a ser applicados à caracterização das drogas, quando SCHLEIDEN mostrou, em 1847, que era possível distinguir as diferentes espécies de salsaparrilha utilizando o microscópio. A partir dessa data o uso de tão prestante instrumento nos estudos farmacognósicos foi-se difundindo, com os trabalhos de WEDDEL (1849), WOWARD (1862) e OUDEMANN (1854-1856).

Mais tarde VOHL, TSCHIRCH e outros iniciaram o estudo microscópico das drogas em pó e com o andar do tempo o número de drogas estudadas foi crescendo sempre, o rigor das investigações microscópicas e a qualidade dos desenhos que as acompanham melhorando progressivamente, até se atingir o grau de precisão que hoje apresentam.

É evidente que o successo da identificação de uma droga depende do conhecimento minucioso dos caracteres microscópicos de exemplares autênticos, e por isso os farmacognosistas têm dispendido grande soma de trabalho em investigações desse género.

Na quietude dos seus gabinetes, tendo como ferramentas um microscópio, um micrótomo, uma dúzia de reagentes e poucos mais instrumentos, aliás bem simples e baratos, o farmacognosista passa horas e horas sentado à sua banca, observando os caracteres microscópicos das plantas medicinais.

Trabalhando cuidadosamente, procurando não deixar escapar nenhum pormenor, vai tomando nota da forma das células, das formações que apparecem no seu interior, da natureza das suas membranas, do modo como elas se agrupam para formar os diversos tecidos, enfim, recolhendo todos os elementos considerados importantes para a caracterização do material em estudo.

Procura ser o mais exacto que é possível ao descrever as suas observações, mas como as palavras, às vezes, podem não traduzir fielmente aquilo que viu, acompanha as suas descrições com desenhos rigorosamente feitos à câmara clara, não se esquecendo, evidentemente, de indicar as respectivas ampliações, para que o seu trabalho se torne verdadeiramente útil aos outros investigadores.

Nada escapa à sua atenção. Se está a estudar uma flor, analisa as diferentes peças florais, desde as sépalas ao estigma, descrevendo a forma das células das epidermes exterior e interior, o aspecto dos tricomas presentes, os tipos de estomas que observou, as células do mesófilo, etc., etc., dando particular atenção aos grãos de pólen, preciosos elementos para a identificação, sobretudo quando a droga se apresenta no estado de pó.

O trabalho é idêntico, quer se trate de uma folha, uma casca, um ramo ou uma raiz. Mas o farmacognosista não se limita apenas a observar e descrever a morfologia das células. Não hesita em dispendir longas horas a medir as células que constituem os diferentes tecidos, tomando nota das suas dimensões em diferentes planos, pois não ignora que a microscopia quantitativa, introduzida na ciência que professa por WALLIS, é, em certos casos, o único meio susceptível de permitir a diferenciação entre duas espécies.

Terminado o seu trabalho, que lhe terá levado alguns meses a realizar, as suas notas poderão constituir, certamente, assunto para uma publicação numa revista da especialidade.

Geralmente, neste género de investigação, aliás bastante meritória e de grande utilidade, o farmacognosista nunca espera fazer descobertas sensacionais. A sua actividade é apenas guiada pelo amor ao estudo e à ciência que pratica, procurando contribuir com o seu esforço para o melhor conhecimento das drogas, para tornar mais precisa a sua identificação.

Acontece, às vezes, que as diferenças histológicas entre duas espécies susceptíveis de se confundirem macroscopicamente são acentuadas, e em tais circunstâncias a sua diferenciação não oferece dificuldades. Mas casos há em que os caracteres microscópicos de algumas espécies são muito semelhantes, registando-se apenas ligeiras diferenças de que, no entanto, quando bem reconhecidas e desde que se lhes atribua valor significativo, fornecem base segura para sua distinção.

Alguns problemas de identificação de drogas, todavia, não podem ser resolvidos com base na observação microscópica qualitativa. Não raras vezes o investigador depara com semelhança de morfologia microscópica tão grande entre duas drogas que, forçosamente, teria que confessar a sua incapacidade para as distinguir.

Em tais casos, porém, a solução do que à primeira vista parecia ser insolúvel está na determinação das dimensões das células. Assim se obtêm certos valores numéricos que tornaram possível a distinção de produtos surpreendentemente iguais, conforme WALLIS tão brilhantemente demonstrou. Um exemplo basta para ilustrar a utilidade do método, hoje universalmente usado por todos os farmacologistas.

Como já dissemos, a morfologia dos grãos de amido de cevada e trigo é tão igual que é impossível distingui-los se o exame microscópico se limitar à observação da respectiva forma. No entanto, WALLIS provou que os grãos de amido de cevada nunca têm um diâmetro superior a  $39 \mu$ , ao passo que um número significativo de grãos de amido de trigo possuem um diâmetro superior a  $40 \mu$ . Aqui está a chave para distinguir os dois referidos amidos, sendo preciso, para isso, determinar apenas as dimensões de um número bastante considerável de grãos.

Muitas drogas em pó, que contenham flores, podem ser correctamente identificadas examinando os grãos de pólen nelas presentes. A identificação destes faz-se, em geral, à custa de três elementos essenciais: a) Dimensões e forma; b) características da superfície da exina; c) presença ou ausência de poros e fendas germinativas.

Um ou outro destes elementos fornece quase sempre a possibilidade de distinguir uma espécie de outras, vizinhas, e há bem pouco tempo acabámos de verificar isso na prática, ao observar que os grãos de pólen da *Datura leichhardtii*, apesar de morfológicamente serem parecidos com os de *Datura stramonium*, são significativamente mais pequenos que os desta última espécie, a ponto de ser possível distingui-las por esta característica.

As dimensões lineares representam o primeiro dos valores numéricos introduzidos por WALLIS nos estudos farmacognósticos, e os exemplos citados mostram bem a sua utilidade na determinação da pureza ou identificação das drogas de origem vegetal. Outras se lhes seguiram, de grande importância do ponto de vista da análise microscópica das drogas. São eles: O «vein-islet number», entendendo-se por «vein-islet» a menor área de parênquima clorofilino rodeada pelos últimos ramos dos feixes condutores; a «relação de palissada»; «células por unidade de área»; «vasos por mm<sup>2</sup>» e «índice de estomas».

Assim, por exemplo o «vein-islet number» permite distinguir o sene de Alexandria do da Índia e a *Digilitalis purpurea* da *D. thapsia*. A «relação de palissada», por sua vez, é usada para diferenciar várias espécies de Buchu, ao passo que várias solanáceas podem ser distinguidas pelos respectivos «índices de estomas».

Mas as possibilidades da microscopia analítica não ficam por aqui. WALLIS conseguiu transformar o microscópio num instrumento capaz de fazer análises quantitativas. Esta é, sem dúvida, uma das mais brilhantes contribuições no domínio da microscopia e o método utiliza como substância de referência os esporos do licopódio.

WALLIS verificou que estes eram surpreendentemente uniformes e que cada mg continha 94 000 esporos. Este é o ponto de partida do seu engenhoso método.

Misturando pesos conhecidos de licopódio e de droga pulverizada, preparando uma suspensão dessa mistura e fazendo preparações dessa suspensão em lâminas, pode determinar-se, contando os esporos presentes, o peso de licopódio visto no campo do microscópio e, tendo em conta as proporções relativas de licopódio e de droga, na mistura inicial, o peso desta.

Se a droga contiver partículas características, susceptíveis de serem contadas, tais como grãos de amido, pólen, células esclerenquimatosas, etc., pode-se ainda calcular o número dessas partículas por mg de substância e este número, por sua vez, servirá para determinar a percentagem da droga pulverizada em misturas.

Sãos estas, em resumo, algumas das muitas aplicações da microscopia analítica. Tendo-as passado em revista pretendemos focar não só a utilidade deste método de análise, como, também, mencionar alguns dos campos em que ele constituiu o processo de escolha e, muitas vezes, o único que conduz a resultados seguros.

Posto isto, parece-me chegada a altura de discutir a competência do farmacêutico como executante das análises microscópicas.

Como atrás dizíamos, o microscopista analítico deve possuir alargados conhecimentos das ciências biológicas para poder enfrentar com êxito os problemas que lhe sejam postos. Será que os farmacêuticos adquirem, durante o seu curso, esses conhecimentos?

Não hesitamos um momento em afirmar que sim e acrescentamos até que a sua preparação científica e técnica os coloca numa posição privilegiada para se dedicarem a este género de análises. Mas não basta afirmar, é necessário demonstrar o que afirmamos e isso vamos tentar fazê-lo.

Como acabámos de ver pelo enunciado dos principais assuntos adstritos à microscopia analítica, estes são muito variados, mas um facto ressalta, imediatamente, desse exame: É que a maior parte deles diz respeito a produtos biológicos, e, dentro destes, a grande percentagem diz respeito a substâncias de origem vegetal.

Ora, acontece que desde tempos imemoriais que o farmacêutico está habituado a lidar com produtos fornecidos pelo reino vegetal, que sempre constituíram uma das fontes mais importantes para a obtenção de medicamentos. Quer isto dizer que a profissão farmacêutica está tradicionalmente ligada à manipulação desses produtos, cujas propriedades e aplicações conhece perfeitamente, quer se trate de substâncias medicinais ou importantes do ponto de vista económico (especiarias, por exemplo).

Como prova do que afirmamos basta recordar que foi um membro da nossa profissão — o desventurado como ilustre TOMÉ PIRES quem, ao escrever a *SUMA ORIENTAL*, se tornou o primeiro naturalista, digno desse nome, que escreveu sobre drogas provenientes do Oriente.

Outro dos cientistas portugueses de quinhentos que escreveu sobre drogas vegetais e se tornou, justamente, admirado por todo o mundo culto da época, foi GARCIA D'ORTA. Este era médico e não boticário, como então se dizia, mas nesse tempo os médicos e, especialmente, GARCIA D'ORTA eram versados em história natural.

As obras de DIOSCÓRIDES, PLÍNIO e dos autores árabes não tinham segredo para GARCIA e daí o carácter único e originalíssimo, para a época, que soube imprimir aos seus «Colóquios dos Simples e das Drogas».

Os exemplos que acabámos de mencionar são a prova de que «The Wright man in the wright place» conduz, invariavelmente, a bons resultados. E julgamos que se o farmacêutico se dedicar às análises microscópicas teremos, mais uma vez, «o homem próprio no lugar conveniente». E porquê?

Simplemente porque o farmacêutico adquire durante o seu curso um somatório importante de conhecimentos científicos e técnicos que fazem dele um dos profissionais mais habilitados a dedicarem-se a microscopia analítica.

Mal inicia os seus estudos, começa logo a travar conhecimento com o microscópio. Na Botânica, além da parte referente à morfologia e fisiologia dos principais grupos de vegetais, apreende, a fundo, a morfologia microscópica dos mesmos.

Ao mesmo tempo inicia o estudo das drogas de origem vegetal usadas na preparação dos medicamentos. Esse estudo é bastante complexo, abrangendo vários domínios, especialmente químico e botânico.

A Farmacognosia é uma ciência puramente e tradicionalmente farmacêutica, apesar das suas íntimas relações com a botânica e a química e ao dedicar-lhe dois anos de trabalho tem o estudante de Farmácia oportunidade para se familiarizar com vários aspectos da microscopia analítica.

É nesta altura que começa a tomar consciência da utilidade daquele método de análise, pois os professores se encarregarão de lhes chamar a atenção para a impossibilidade de reconhecer certas drogas sem recorrer ao seu exame microscópico. E como o ensino é teórico e prático, o aluno terá ocasião de verificar por si a veracidade do que ouve afirmar.

Também na Farmacognosia, durante cujas aulas práticas tanto uso se faz do microscópio, o aluno começa a tomar contacto com os valores numéricos introduzidos por WALLIS e outros e cedo aprende a reconhecer a sua utilidade.

Assim, por exemplo, é costume os alunos procederem ao exame microscópico de variadíssimas drogas, entre elas, os amidos, determinando os diâmetros dos respectivos grãos, e quase sempre aprendem a reconhecê-los quando misturados, um acto concreto de microscopia analítica.

Durante o resto do curso, o estudante de Farmácia nunca mais deixa de trabalhar com o microscópio, tendo, assim, oportunidade de ir adquirindo uma perspectiva cada vez mais ampla do seu emprego, ao mesmo tempo que vai melhorando, progressivamente, a sua técnica microscópica. Desde o primeiro ao último ano do seu curso, o aluno de Farmácia tem sempre, no seu *curriculum*, uma ou mais cadeiras cujo estudo implica, obrigatoriamente, o uso do microscópio como instrumento de trabalho.

Por isso, quando no 5.º Ano o aluno frequenta as Análises Bromatológicas está apto a proceder à maioria dos exames microscópicos que é habitual fazer-se.

Durante os cinco longos anos que dura a licenciatura em Farmácia, os que a frequentam aprendem a preparar medicamentos, seu principal objectivo. Mas simultaneamente, de um modo muito subtil, quase inconscientemente, vão-se treinando em muitos domínios da análise microscópica.

Por este motivo pensamos, convictamente, que o farmacêutico, chegado ao fim do seu curso, adquiriu como nenhum outro profissional, os conhecimentos teóricos e a habilidade técnica para se tornar um bom microscopista. Através da aprendizagem que fez está estrutural e potencialmente apto a dedicar-se à microscopia analítica. Para que essa aptidão se manifeste em plena pujança apenas é necessário que o futuro analista revele um gosto e inclinação especiais para este género de trabalho e se entregue a ele com verdadeira paixão.

A mestria, a perícia no uso do microscópio, essas virão depois e naturalmente, à medida que o tempo passa e a prática se vai alargando.

## V SECÇÃO

### TOXICOMANIA, FLAGELO SOCIAL

J. SOUTO TEIXEIRA

Director dos Serviços Técnicos  
Exercício de Farmácia e Comprovação de Medicamentos  
(Direcção Geral de Saúde)

É decorrido pouco mais de meio século sobre a data em que teve início no plano internacional a luta contra o uso indiscriminado das drogas estupefacientes. Em 1909, reuniram-se em Changai os delegados de treze países para estudar os problemas referentes ao consumo do ópio na China. E, 50 anos mais tarde, em 1959, em Genebra, 15 delegações e 27 observadores de diversos países assistem à sessão anual da Comissão dos estupefacientes das Nações Unidas para examina-rem os problemas de natureza sanitária e social, motivados pelo consumo do haxixe no Médio Oriente, pelo uso de mastigar as folhas de coca na América do Sul e a toxicomania proveniente do abuso da heroína na América do Norte. Quando se reuniu a conferência de Changai, havia a convicção, embora vaga, de que o problema do ópio não era possível enfrentar-se com sucesso sobre o plano exclusivamente nacional. Hoje, o princípio do «contrôle» internacional dos estupefacientes é universalmente admitido e a luta contra a toxicomania e o tráfico ilícito dos estupefacientes, prossegue sem desfalecimento no mundo inteiro e, para a conseguir com êxito, dado os problemas novos que surgem dia a dia, torna-se necessária uma colaboração mais estreita intergovernamental cuja primeira manifestação organizada foi a criação da Comissão do Ópio de Changai.

2. Não só na China, como noutras regiões do Extremo Oriente, aumentava de um modo inquietante o uso do ópio de fumar. Já nos meados do séculos XIX, as chamadas guerras do ópio tinham como objectivo manter aberto o mercado chinês ao comércio do ópio proveniente da Índia; depois verifica-se um crescente consumo da morfina durante a Guerra da Secessão, nos Estados-Unidos, de 1861 a 1865. Em 1900 aparece no mercado a heroína e foi preciso esperar uma dezena de anos para se reconhecerem os seus graves inconvenientes.

No século XVI, o Grão Turco tinha proibido o uso do ópio e de haxixe. Nos meados do século XVIII interdita-se na China a venda do ópio e a abertura de lugares onde se fumava e no século XIX novos esforços foram levados a cabo para evitar o mal que se alastrava. Embora em 1800 se tivesse proibido a importação do ópio, ele continuava a entrar no país em grandes quantidades. Porém, em 1853, o Tratado de Tiestsin legaliza de novo o comércio. Enfim, em 1906, um grande passo se deu quando na China se proibiu a cultura da papoila que produz o ópio. A medida deu resultados satisfatórios e em 1908 a Grã-Bretanha, na qual a opinião pública se interessou vivamente pela solução do problema, aceitou reduzir as importações do ópio da Índia com destino à China, durante um período experimental de 3 anos, com a condição de que neste país se procedesse a reduções substanciais na sua produção nacional, ainda existente no seu vasto território e nas importações provenientes de outros países. Foi neste ambiente e com o fim de auxiliar

a China nesta tarefa imensa que se reuniu em Changai, a Comissão Internacional do Ópio. A iniciativa deveu-se principalmente ao Presidente Teodoro Roosevelt. Em 1908, o Governo dos Estados Unidos tinha proibido o uso do ópio nas Filipinas a não ser para usos medicinais e chamado a atenção dos países da Europa e do Extremo-Oriente aos quais interessava o problema. Na Comissão estavam representados os seguintes países: Alemanha, Áustria, Hungria, China, Estados Unidos, França, Grã-Bretanha, Itália, Japão, Holanda, Pérsia, Portugal, Rússia e Sião. Por unanimidade, os delegados adoptaram nove resoluções, nas quais convidavam os respectivos Governos a suprimir nos seus territórios o uso do ópio de fumar, a limitar o uso da morfina só a fins médicos e a instituir um «contrôle» nacional da morfina e outros derivados do ópio.

Os delegados reunidos em Changai não tinham os poderes para assinar um instrumento diplomático. Mas foi, sem dúvida, devido aos seus esforços que se acordou, em Haia, três anos mais tarde, na primeira Convenção Internacional do Ópio que instituiu regras quanto ao comércio e uso dos estupefacientes, criando-se direito internacional com carácter multilateral.

A Convenção de Haia, de Janeiro de 1912, previa a supressão progressiva do ópio de fumar; o emprego dos estupefacientes, morfina, outros opiáceos e cocaína, seria limitada somente a usos médicos ou legítimos e a sua fabricação, venda e uso eram submetidos a determinadas autorizações e registos. Assim se criou, sob forma rudimentar, o regime dos estupefacientes ao nível nacional. Nenhuma instituição internacional especial tinha sido prevista para executar a aplicação destas decisões; as partes contratantes, porém, ficaram na obrigação de enviar ao Governo Holandês os seus textos legislativos e as estatísticas pertinentes. A obrigação que tinham os países participantes de colaborar numa campanha internacional contra a toxicomania, já não era uma simples obrigação moral, mas tornou-se um dever segundo o direito internacional.

3. Em conformidade com os tratados de paz, após a primeira grande Guerra Mundial, todas as nações participantes que ainda o não tinham feito aderiram à Convenção de Haia. Nos termos do art. 28.º do Pacto da Sociedade das Nações, esta assumia a responsabilidade do «contrôle» geral, em plano internacional, dos acordos relativos ao tráfico do ópio e outras drogas nocivas.

Em 1920 a Sociedade das Nações criou a *Comissão Consultiva do Tráfico do Ópio*. Esta comissão, como a *Comissão dos Estupefacientes do Conselho Económico e Social das Nações Unidas* que lhe sucedeu, era constituída por países e não por membros a título individual. Desempenhando funções de órgão administrativo internacional em matéria de estupefacientes, ficava encarregada de dar pareceres à Assembleia, referentes ao «contrôle» internacional. A Comissão Consultiva, como ulteriormente a Comissão das Nações Unidas, compreendia os Estados mais interessados na matéria, isto é, os principais fabricantes de estupefacientes e os produtores de matérias-primas vegetais necessárias para a sua fabricação bem como os países nos quais o tráfico ilícito constituía um grave problema.

Em 1924, teve lugar uma nova conferência, em Genebra, para se ocupar especialmente do uso do ópio de fumar no Extremo-Oriente. E, em 1925 foi assinado um acordo que tinha por fim exercer uma vigilância eficiente dos traficantes e suprimir progressivamente o uso do ópio, constituindo-se monopólio dos Estados no que se refere à produção, importação, vendas e distribuição de ópio preparado, assim como sistemas apropriados de licenças e racionamento. A Convenção de 1925, elaborada a partir do Acordo de 1912, instituiu o sistema actual de licenças e de registos para as transacções de estupefacientes assim como a obrigatoriedade de relatórios às autoridades internacionais sobre o modo como eram cumpridos os preceitos da Convenção nos diversos países. O sistema de licenças passou a aplicar-se a cada importação das matérias-primas e à exportação das drogas manufacturadas. Antes de 1925, a Comissão Consultiva do Ópio tinha já precon-

zado a adopção dum sistema análogo mas tal não se tinha generalizado. A Convenção criou um órgão independente, o *Comité Central Permanente do Ópio*, encarregado de examinar as estatísticas periódicas que os Governos teriam de fornecer no que se refere às matérias-primas agrícolas donde são extraídos os estupefacientes naturais, assim como as referentes à fabricação, importação, exportação, consumo, «stocks» e as apreensões provenientes do tráfico ilícito. A Convenção foi assinada por 41 nações. E, de acordo com as suas disposições, foi publicado no nosso País, em 24 de Agosto de 1926, o Decreto n.º 12 210, disposição legal ainda em vigor.

Não atingiu a Convenção os fins que seriam para desejar. Daí as críticas de que foi alvo, porquanto ao instituir regras burocráticas bastante precisas não atacava o problema social de fundo, isto é, a progressão acelerada da abolição do ópio de fumar, do consumo para fins não médicos do cânhamo, nem o hábito de se mascarem as folhas da coca.

Por tais razões, e porque a superprodução de estupefacientes encorajava o tráfico ilícito, em 1931, 57 representantes de Estados reunem-se em Genebra e adoptaram a «*Convenção para limitar o fabrico e regulamentar a distribuição dos estupefacientes*». A Convenção entrou em vigor em 1933 e tinha como objectivo instituir uma espécie de economia mundial planificada dos estupefacientes. Embora esta Convenção não tivesse sido ratificada pelo Governo Português, o que só sucedeu mais tarde, ela foi aplicada e rigorosamente cumprida pelas autoridades sanitárias nacionais. Cada parte contratante forneceria anualmente uma avaliação dos estupefacientes manufacturados necessária somente para usos médicos e científicos. A partir das avaliações calculam-se os contingentes máximos de fabricação e importação em cada país ou território não autónomo. A Convenção criou um órgão específico que se encarregaria de estudar as avaliações e de estabelecer em cada ano um programa referente às necessidades prováveis mundiais de estupefacientes.

A Convenção instituiu assim um dispositivo legislativo internacional segundo o qual os novos estupefacientes pertencentes a certos grupos químicos, tirante os estupefacientes sintéticos que então eram desconhecidos, podiam ser colocados sob «*contrôle*» internacional e que as partes contratantes teriam de cumprir. Por outro lado, aumentava-se o número de requisitos da responsabilidade dos Estados, exigindo-se, se necessário, informações minuciosamente sobre casos considerados importantes de tráfico ilícito e um relatório anual referente à administração dos estupefacientes nos países ou territórios interessados.

No decorrer dos debates sobre o tráfico ilícito, a Comissão Consultiva tinha reconhecido que muitos traficantes, sobretudo os mais perigosos, por vezes ficavam impunes porque os princípios da legislação penal internacional variavam de país para país e que os respectivos serviços nacionais de repressão não cooperavam directamente entre si. Era particularmente aflitivo ver certos serviços de repressão serem reduzidos ao papel de simples espectadores, inermes e inertes, enquanto os chefes dos bandos de traficantes dirigiam as suas operações criminosas dum país estrangeiro. Foi por esta razão que teve lugar uma nova conferência em 1936, em Genebra, tendo como objectivo fundamental a luta contra o tráfico ilícito.

4. No começo da segunda Guerra Mundial havia ainda algumas deficiências no «*contrôle*» internacional dos estupefacientes. Mas não devemos esquecer a imensidade da tarefa realizada pela Sociedade das Nações e os progressos constantes no sentido de se elaborar um sistema eficiente em face das dificuldades que todos os dias surgiam. A administração internacional continuou a exercer algumas das suas funções durante a segunda guerra mundial. A Grã-Bretanha, a Holanda e a França encorajadas pelos Estados Unidos e tendo em vista os problemas graves que surgiram com as populações refugiadas tinham tomado a iniciativa

de suprimir drásticamente nos seus territórios o uso do ópio de fumar. Portugal seguiu o apelo procedendo do mesmo modo em Macau.

Em 1946, o Conselho Económico e Social das Nações Unidas, criado neste mesmo ano, constituiu a Comissão dos Estupefacientes que retomou as funções da Comissão Consultiva do Tráfego do Ópio e outras drogas novas e a Assembleia Geral aprovou o Protocolo que transferia as funções exercidas, em matéria de estupefacientes dos órgãos da Sociedade das Nações para os órgãos correspondentes das Nações Unidas. Continuou assim um sistema eficaz de «contrôle» mundial de estupefacientes que deu as suas provas durante um quarto de século. Mas havia muito mais a fazer principalmente em face de novos problemas que surgiam.

Os tratados nos quais assentava o «contrôle» internacional, antes da guerra, apresentavam, como se disse, grandes deficiências. Diversos Governos não cumpriam as suas obrigações internacionais porque se encontravam em situação delicada em matéria de estupefacientes quer por deficiência de organização interna e burocrática, como, para alguns, do facto de não exercerem uma autoridade efectiva sobre alguns dos seus territórios periféricos. Tem tido a organização das Nações Unidas como finalidade dois objectivos principais: melhorar o regime dos tratados em vigor e dar assistência técnica aos países que não possuem organismos nacionais eficientes. Com efeito, em tais tratados não se permitia controlar com eficácia a produção e o comércio dos produtos vegetais (ópio, folhas de coca, cânhamo, palha de papoila) matérias-primas de todos os estupefacientes conhecidos em 1939 e que se chamavam genericamente estupefacientes naturais. Limitando o uso dos estupefacientes manufacturados às necessidades médicas e científicas, não se evitava o emprego do ópio, do cânhamo ou das folhas de coca a fins não médicos. Por outro lado, quando se redigiram os tratados não se previa a descoberta dos estupefacientes sintéticos, de modo que este novo problema não podia ser resolvido satisfatoriamente no quadro do sistema adoptado antes da guerra.

Nesta conformidade, o Protocolo de 1948, assinado em Paris, teve por finalidade completar as disposições do de 1931, por forma a colocar sob o «contrôle» novas drogas, nomeadamente as sintéticas, susceptíveis de provocar a toxicomania e limitar o seu fabrico às necessidades médicas e científicas.

A acção da Comissão Consultiva no sentido de melhorar os acordos estabelecidos quanto aos estupefacientes ditos naturais foi culminada por um plano um tanto arrojado que previa a criação de um monopólio internacional do ópio com inspecção também internacional.

Daí o Protocolo das Nações Unidas, que foi aprovado por plenipotenciários que se reuniram, em 1953, em Nova Iorque. Nos termos deste Protocolo os países produtores deveriam instituir um regime que equivaleria a um monopólio do Estado. Só determinados Estados poderiam produzir ópio para exportação. Alguns deles, como o Afeganistão e o Irão, proibiram a cultura da papoila do ópio, fazendo assim um esforço no sentido de demover as dificuldades que suscitava o «contrôle» da droga. Quanto à produção das folhas de coca, o Conselho Económico e Social enviou uma delegação de técnicos à Bolívia e ao Perú com o fim de estudar as possibilidades de limitar a produção e suprimir o hábito da sua utilização entre os nativos. Os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo-se verificado uma progressiva diminuição da produção que, no presente, praticamente, é sòmente a necessária para cobrir as necessidades de ordem médica, científica ou outras.

Embora as disposições dos tratados internacionais em vigor só permitissem o consumo do cânhamo para fins lícitos, por inquérito realizado em 1958, o Comité Central Permanente do Ópio verificou que ele nas suas variedades de haxixe, charás, bang, ganga, mariúana maconha e outras denominações ainda era usado em 26 países e territórios. As dificuldades para reprimir o seu consumo são de vária ordem dado que a planta cresce espontaneamente em vastas regiões do

globo e é utilizada para fins industriais ou na medicina popular, principalmente na Índia e no Paquistão. Porém, os progressos realizados depois da guerra são manifestos e há a tendência para proibir o uso do cânhamo para qualquer fim, incluindo para fins médicos tal como vem expresso na Convenção Única, aprovada na Conferência de Plenipotenciários que se realizou na sede das Nações Unidas, de 24 de Fevereiro a 17 de Março de 1961.

Nesta Convenção reuniram-se num único instrumento diplomático todas as disposições das Convenções e Protocolos em vigor, trazendo para os Estados novas obrigações nomeadamente a criação de administrações especiais, em todos os Estados que se ocupem do problema dos estupefacientes e da obrigação de se tomarem as providências necessárias para o tratamento nacional dos toxicómanos. Uma Comissão interministerial entre nós foi nomeada para dar parecer sobre problemas referentes ao tráfego de estupefacientes, com representantes dos Ministérios dos Negócios Estrangeiros, da Saúde e Assistência, da Justiça, do Interior, do Ultramar e das Finanças e com as atribuições da Comissão criada pelo Decreto n.º 18 845, de 1 de Junho de 1931 que instituiu no Ministério dos Negócios Estrangeiros, junto da Secretaria da Sociedade das Nações, uma Comissão interministerial para estudar os problemas referentes a estupefacientes. Ressalvados certos problemas que se relacionavam com as Províncias Ultramarinas e dado que na Lei n.º 2066, de 11 de Maio de 1945, que promulgou as bases da Assistência Psiquiátrica, se diz na sua Base X que os asilos psiquiátricos compreendem «e) Colónias e Casa de recuperação para alcoólicos, toxicómanos e afectados de outras anomalias», propôs-se superiormente a adopção por parte do Governo Português da Convenção Única sobre estupefacientes.

5. Com a descoberta de estupefacientes obtidos por síntese não pertencentes a grupos químicos de alcalóides provenientes do ópio ou da coca, surgiu um novo problema que não estava previsto nos convénios internacionais anteriores a 1939. Eles são fabricados a partir de substâncias correntes como os sub-produtos do alcatrão da hulha ou do petróleo.

Antes das descobertas destas drogas, era possível antever os grupos químicos aos quais pertenciam os novos estupefacientes fabricados. O problema tornou-se grave porque a experiência mostrou que novas substâncias descobertas, aceites pela clínica, com acção essencial analgésica, provocaram numerosos casos de toxicomania antes de serem submetidas a «contrôle» internacional. Foi então encarregada a Organização Mundial de Saúde de proceder a estudos pertinentes no sentido de se tomarem medidas em relação a novas drogas tendo em vista a sua acção farmacológica com a estrutura química. Porém, no estado actual dos conhecimentos científicos não é possível determinar com precisão as drogas que possam produzir a toxicomania embora se reconheça que esse perigo possa existir naquelas que têm uma forte acção analgésica. As dificuldades crescem à medida que se verifica o progresso científico agravadas por numerosas denominações comerciais o que dificulta a sua identificação. A acção da O. M. S. tem sido particularmente profícua quer reduzindo-se ao mínimo as drogas que não ofereçam vantagem terapêutica e tenham propriedades toxicomanígenas, quer procurando uma denominação internacional para tais drogas que entram no mercado e que os serviços de «contrôle» possam facilmente identificar.

Na maioria dos estudos sobre a acção analgésica, a morfina tem sido tomada como padrão. Isolada em 1805 por SERTÜNER, só em 1925, por GULLAND y ROBINSON foi proposta a sua primeira estrutura molecular, corrigida em 1952 por Gate e seus colaboradores que procederam à sua síntese. Uma segunda síntese foi descoberta, em 1954, por GINSBURG e seus colaboradores. A estrutura molecular da morfina é formada por um sistema complexo de cinco núcleos, compreendendo um certo número de grupos periféricos susceptíveis de serem modificados em grande número de pontos. São numerosos os estudos no sentido de se verificarem as modificações entre os derivados obtidos e a acção analgésica que lhes corres-

ponde ou identificar as fracções da molécula responsáveis por essa acção. Contam-se por centenas os derivados da morfina que têm sido estudados, sendo os principais agrupados pelo seguinte modo:

### 1. Modificações dos grupos hidroxílicos

A acção analgésica aumenta com um grupo hidroxílico fenólico livre e diminui com grupo hidroxílico alcoólico livre.

Tal facto verifica-se não só no grupo morfínico como nos analgésicos sintéticos de tipos diferentes.

### 2. Saturação do núcleo alcoólico

O efeito da modificação na acção analgésico é variável e resulta, habitualmente, num acréscimo, mas depende, em certa medida da molécula restante.

### 3. Modificação do núcleo azotado

A morfina possui um azoto terciário metilado num núcleo de estrutura análoga à da petidina. A característica terciária do azoto é essencial: encontra-se um azoto terciário em todo o analgésico poderoso qualquer que sejam as restantes características químicas.

O núcleo de estrutura piperdínica que se encontra na molécula da morfina e dos seus derivados é igualmente essencial.

### 4. Novo grupo de substituição fixado no núcleo aromático ou alicíclico

A adição de novos grupos de substituição às fracções aromáticas ou alicíclicas da molécula da morfina, traz, em geral, uma diminuição do poder analgésico.

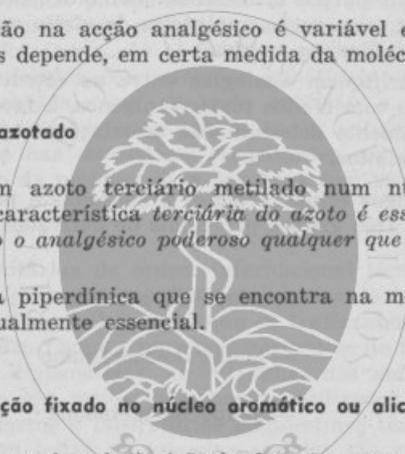
### 5. Ruptura do ponto ácido

Esta modificação parece ter por efeito uma diminuição da actividade analgésica.

Pode-se, como se disse, distinguir na estrutura molecular da morfina, fracções ou estruturas mais simples, idênticas às que se encontram noutros compostos analgésicos. Partindo destas estruturas podem-se obter compostos derivados de actividade analgésica de efeito morfínico, tal como sucede com o fenantreno, o dibenzofurfurano, o carbazol e as fenil e defenil-etilaminas.

A síntese do morfinamo e de seus derivados veio pôr mais em evidência uma estreita semelhança da estrutura em relação à actividade analgésica. Embora esta seja fraca neste composto, alguns dos seus derivados possuem-na em alto grau, — mais do dobro da morfina, no *Levorfanol*.

WALLEN concebeu que havia um paralelismo estreito entre as propriedades analgésicas da morfina e uma estrutura fenantrénica e esta concepção prevaleceu durante perto de 40 anos. Com base nesta teoria foram preparados um grande número de compostos fenantrénicos mas, com desapontamento dos investigadores, poucos de entre eles possuíam acção analgésica de efeito morfínico. E, conquanto se admitisse a possibilidade de um grau elevado de acção analgésica com estru-



Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

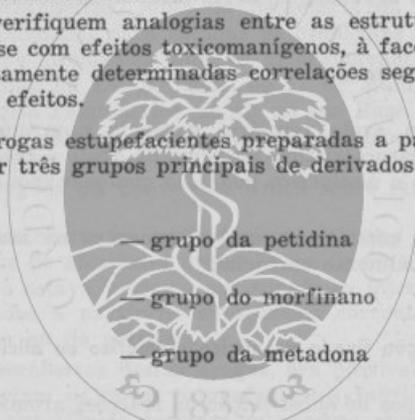
turas mais simples do que a da morfina, suas fracções ou do morfina, até ao aparecimento da petidina só os derivados da morfina, da tebaina ou da codeína, sucedâneos do ópio e da estrutura análoga, foram utilizados na clínica como analgésicos e com propriedades toxicomanígenas.

A descoberta da petidina, em 1940, uma fenil-4-piperidina, teve uma importância considerável nas investigações futuras, reconhecendo-se que uma estrutura fenilpiperidínica podia encontrar-se na molécula da morfina. Tal facto levou SCHAUMAN a criar o termo «analgifórico» e pôr a hipótese de que seria condição necessária para que uma substância possuía actividade de efeito morfínico, o facto de ela conter na sua estrutura um sistema metil-1-fenil-4-piperidina com um carbono quaternário na posição 4, porquanto com a ruptura deste sistema desaparece a acção analgésica da morfina e da petidina.

Porém, com a descoberta das metadonas, que não possuem tal sistema, a teoria de SCHAUMAN parece infirmar-se. Por outro lado, tem-se descoberto outros produtos de síntese, com acção analgésica de efeito morfínico, nomeadamente nos derivados das dietinilbutenó-aminas.

Embora se verifiquem analogias entre as estruturas moleculares de vários produtos de síntese com efeitos toxicomanígenos, à face dos conhecimentos actuais não estão concretamente determinadas correlações seguras entre a sua estrutura molecular e esses efeitos.

Tirante as drogas estupefacientes preparadas a partir dos alcalóides do ópio, pode-se considerar três grupos principais de derivados entre os sintéticos:

- 
- grupo da petidina
  - grupo do morfina
  - grupo da metadona

Dos derivados dos alcalóides do ópio contam-se 24 produtos sob «contrôle» internacional e denominação comum proposta pela Organização Mundial de Saúde. Dos grupos referidos contam-se 52. Destes só 9 estão autorizados a prescreverem-se no País sob diversas marcas de medicamentos especializados.

Aparecem no mercado, sem cessar, drogas que sem serem consideradas toxicomanígenas são, contudo, em certas circunstâncias susceptíveis de conduzir ao seu uso imoderado. Os barbitúricos e certos atarácicos ou tranquilizantes pertencem a esta categoria. A O. M. S. tem convidado insistentemente os Governos a tomarem medidas apropriadas de modo a impedir o seu consumo abusivo, principalmente das anfetaminas e dos barbitúricos. No nosso País algumas providências têm sido tomadas nesse sentido, ficando a sua dispensa ao público dependente de receita médica. Alguns países tiveram mesmo de tomar medidas drásticas contra o abuso destas drogas, como sejam o Japão e os Estados Unidos nos quais o consumo indiscriminado das anfetaminas, no primeiro, e dos barbitúricos, no segundo, chegou a ser considerado verdadeiro flagelo social.

É geralmente aceite que a toxicomania provocada pelos estupefacientes sintéticos é menos perigosa que a provocada pela morfina e principalmente pela heroína. Sem dúvida que este é de todos os mais perigoso. A O. M. S. tem vindo a aconselhar os Governos a restringirem o seu consumo ou mesmo eliminá-lo da prática clínica.

Alguns países têm gradualmente restringido a sua produção e consumo; outros, e entre eles o nosso, proibiram o seu fabrico e importação. É, porém, ainda a droga que mais se transacciona no mercado ilícito.

Entre os sintéticos verifica-se, de um ano para outro, um aumento de consumo considerável da *petidina*. Em 1950, gastaram-se no País 7 quilos desta droga; dez anos decorridos o consumo atingiu 40 quilos e no presente ano a quantidade máxima autorizada ascende a 100 quilos — mais de 20 vezes o previsto para a totalidade dos restantes produtos sintéticos. E verifica-se nos países mais evoluídos que, à maneira que diminuem os toxicómanos dos derivados do ópio aumentam os *petidinómanos*, embora em menor escala, e as estatísticas revelam que entre estes são mais numerosos os que, na ânsia de se curarem, trocaram pela *petidina* a droga opiácea ou a receberam por intermédio de receita médica.

São raras as apreensões da *petidina* no tráfico ilícito. Depois de inquérito realizado por peritos da O. M. S. parece concluir-se que o corpo médico não está suficientemente esclarecido quanto ao perigo da toxicomania produzida pela *petidina*, porque, na maioria dos casos, são os médicos que a prescrevem e renovam a prescrição para tratar doentes com afecções somáticas ou mentais crónicas. É talvez pela razão apontada, que se pode explicar a grande proporção de médicos e de enfermeiros que se encontram entre os *petidinómanos*, proporção superior à que se encontra nas estatísticas respeitantes aos opiáceos. Aconselha a O. M. S. que a prescrição da *petidina* deve ser feita com as mesmas precauções usadas para a morfina.

6. Se as medidas sanitárias de ordem internacional têm sido frutuosas no combate à toxicomania, infelizmente verifica-se no presente que o tráfico ilícito internacional é ainda importante. Os preços que os traficantes vendem as drogas atingem somas fabulosas. Em face da repressão servem-se de todos os meios para realizar o negócio: malas diplomáticas, as entranhas dos animais, as aberturas naturais do corpo humano são meios vulgarmente utilizados para que a droga passe as fronteiras. Aeroportos e laboratórios clandestinos têm sido assinalados; descobrem-se traficantes em todas as camadas sociais; são capazes de tudo, de jogar a vida e de praticar as mais torpes vilanias. A «Interpool» está adstrita, no plano internacional, o combate aos traficantes, tarefa difícil não só devido a insuficiências do «contrôle» em plano nacional mas também por outros factores difíceis de debelar. Na época actual, caracterizada por transformações políticas e sociais rápidas, pela instabilidade e inquietação, surge, por vezes, terreno fértil para o desenvolvimento da toxicomania e consequentemente o tráfico ilícito. Em auxílio da repressão bastante tem concorrido a assistência técnica da Comissão Consultiva do Ópio e da Organização Mundial de Saúde. Assim, têm sido devados a termo estudos científicos no sentido de se procurar, mediante trabalhos laboratoriais, as características particulares do ópio ou do cânhamo de modo a saber-se a sua origem. Logo que as autoridades nacionais tenham procedido a uma apreensão destes produtos, os Serviços Técnicos da Comissão Consultiva, na maioria dos casos, à qual amostras são enviadas, depois dos ensaios analíticos realizados, indicam a sua proveniência provável, o que pode dar esclarecimentos úteis aos serviços policiais de repressão. Porém, a função primordial dos organismos internacionais consiste em coordenar a luta contra a toxicomania nos diversos países.

7. Foi só em 1949, que a O. M. S. deu uma definição objectiva de toxicomania. A definição clínica admitida, seria a apetência prolongada que têm certos indivíduos para as substâncias tóxicas que eles descobriram fortuitamente ou procurado voluntariamente o efeito analgésico, eufórico ou dinâmico; esta apetência torna-se quase tiranicamente um hábito e é acompanhado na maioria das vezes, por aumento progressivo das doses. Esta definição clínica é talvez incompleta. Já em

1931, a Comissão dos Estupefacientes da Sociedade das Nações, tentou, sem o conseguir, dar uma definição unívoca da toxicomania, dada a diversidade das drogas nocivas que seriam abrangidas pelas convenções internacionais.

A definição da O. M. S., é a seguinte:

«A toxicomania é um estado de intoxicação periódica ou crónica, nociva ao indivíduo ou à sociedade, produzida pelo consumo repetido de uma droga natural ou sintética, com as seguintes características:

- a) um invencível desejo ou uma necessidade de continuar a consumir a droga e de a procurar por todos os meios;
- b) uma tendência a aumentar as doses;
- c) uma dependência de ordem psíquica e por vezes física relativamente aos efeitos da droga.»

Já na Convenção de 1931, os Governos se comprometiam a organizar nos seus territórios a luta contra a toxicomania, tomando as medidas necessárias para para impedir o seu desenvolvimento e especialmente se recomendava, quanto ao hábito de fumar o ópio, de melhorar as condições de vida das classes da população onde se recrutam os fumadores e desenvolver os serviços médico-sociais de propaganda, auxiliando aqueles que sinceramente pretendem desintoxicar-se, ampará-los na fase de recuperação e protegê-los contra as tentativas de recidiva.

Em 1956, um grupo de estudo foi encarregado pela O. M. S. de verificar o tratamento dos toxicómanos e constatou com satisfação que era fácil persuadir um grande número de toxicómanos a submeter-se a tratamento adequado. O grupo de estudo, reconheceu ainda que, grande parte deles vive em países onde o uso de certos estupefacientes têm sido tradicionalmente admitidos. Estes toxicómanos são indivíduos que circunstâncias mais ou menos acidentais, como o desespero, o esgotamento físico ou psíquico, a fome ou a miséria, levava-os a procurar nas drogas um quimérico e fugaz lenitivo. Mas também andam pelo mundo e em todos os países, homens que «têm a necessidade de abafar a voz da razão e de se tornarem incapazes de discernir o desacordo entre a sua maneira de viver e os escrúpulos da sua consciência». São os toxicómanos em potência.

De qualquer modo compete aos Estados combater o flagelo para que não alastre o mal e proceder ao tratamento médico-social, à sua profilaxia e à recuperação dos toxicómanos.

8. Depois de meio século de esforços empreendidos ao nível internacional para lutar contra os abusos dos estupefacientes, a toxicomania continua a ser um grande problema para milhões de indivíduos espalhados pelo mundo. Mas esta triste observação não poderá fazer esquecer que os resultados obtidos, graças ao «contrôle» internacional dos estupefacientes, representa uma obra de que pode justamente orgulhar-se a comunidade das nações. Comparada ao que era há meio século, a toxicomania diminuiu sensivelmente em vastas regiões do mundo. E obteve-se estes resultados não obstante as duas guerras mundiais e a tensão política que, suscitando a inquietação dos homens criaram um clima favorável ao desenvolvimento da toxicomania. Não é possível mencionar dados exactos, mas segundo indicações objectivas, o número dos toxicómanos diminuiu consideravelmente.

Mais importantes ainda foram os efeitos preventivos do «contrôle». No século XIX, em muitos países, as populações podiam, para aliviar o sofrimento ou a miséria, utilizar estupefacientes sem receita médica. Vendiam-se produtos farma-

céticos que continham esupezfacientes como remédio para todos os males e constituíam objecto de vasta publicidade. O «contrôle» internacional suprimiu este abuso das drogas tóxicas toximanígenas e poupou a inúmeros indivíduos a triste sorte do que as usam. Há apenas trinta anos, uma grande parte dos estupefacientes destinados ao consumo ilícito provinham de fábricas de drogas legalmente autorizadas. O «contrôle» internacional dos estupefacientes pôs fim a esta situação deplorável e a quantidade de estupefacientes desviada do comércio lícito para alimentar o tráfico ilícito é insignificante. O «contrôle» internacional contribuiu igualmente para chamar a atenção do corpo médico para os perigos que representa o uso dos estupefacientes. Os médicos, de um modo geral, e os farmacêuticos não prescrevem ou aviam estupefacientes senão em casos excepcionais o que reduz o risco de se verem multiplicar as toxicomanias de origem terapêutica. Em muitos países, o ópio e o cânhamo eram vendidos livremente por monopólios do Estado para alimentar o tesouro público. Pôs-se fim a esta situação vergonhosa.

Se se realizou uma obra importante, a situação não permite um optimismo exagerado. Onde subsistem más condições sociais e económicas, estas continuam a favorecer a toxicomania. Tomados de pavor perante meios monstruosos de aniquilamento que têm sido postos à prova e presa das tensões cada vez mais prementes da vida moderna, os homens são tentados a procurar nas drogas um lenitivo fictício. Traficantes sem escrúpulos estão prontos a explorar quaisquer possibilidades para escapar ao «contrôle» que lhes oferece o progresso científico ou enfraquecimento da autoridade repressiva. É também encorajante notar a importância do «contrôle» internacional que é geralmente reconhecida, como o mostra o interesse com que as nações que recentemente obtiveram a sua independência, oferecem a sua colaboração para lutar contra o abuso dos estupefacientes. As suas vantagens são universalmente reconhecidas como um exemplo de frutuosa cooperação internacional e os Governos reconhecem unanimemente a sua necessidade. O sucesso deste empreendimento revela possibilidades que existem noutros sectores, desde que os Governos estejam decididos a harmonizar os seus interesses e a organizar as suas relações no âmbito das organizações internacionais tais como as Nações Unidas e as suas instituições especializadas nomeadamente a Organização Mundial da Saúde.

9. Mostram as estatísticas que o nosso País se conta entre os primeiros nos quais a toxicomania ou o tráfico ilícito dos estupefacientes não constitui problema. E o mesmo pelo Portugal Ultramarino. Deixou de se fumar o ópio em Macau, destrói-se sistematicamente nas províncias africanas o cânhamo espontâneo. Nos últimos dez anos não houve necessidade de se proceder a qualquer apreensão de estupefacientes no tráfico ilícito. E se um ou outro toxicómano aparece nas farmácias, com receitas falsificadas ou sem elas, é pelos farmacêuticos facilmente detectado e por eles dado o alarme aos organismos oficiais de repressão para procedimento imediato. Em geral, trata-se de toxicómanos de origem terapêutica. Mantém a Direcção-Geral de Saúde uma estreita colaboração com a Ordem dos Médicos e com a comunidade dos farmacêuticos apoiando os serviços policiais de repressão. Competindo ao Estado coodificar as leis naturais em defesa da saúde e bem-estar dos cidadãos, uma das suas principais funções neste particular, é de prescrever normas dos serviços médico-farmacêuticos para execução das leis sanitárias. Podemos afoitamente afirmar, com a responsabilidade das funções oficiais que nos estão adstritas, que o lugar de relevo que o nosso País ocupa na luta contra a toxicomania, longe de entre nós ser considerada como um flagelo social, se deve, em grande parte, à colaboração que a comunidade dos farmacêuticos tem prestado aos serviços oficiais. É pela farmácia que se distribuem os medicamentos e mal vai se eles passam por mãos que não sabem mexer neles. Todos os medicamentos são venenos, como disse Claude Bernard, tanto mais perigosos quanto mais eficazes e cuja acção imediatamente favorável aumenta por

vezes a largo prazo, mas pode trazer consequências deploráveis. O farmacêutico, é certo, não pode aviar certos produtos se não por receita médica. Porém, em muitos casos ele faltaria gravemente ao seu dever social e ao papel que a sociedade espera dele, se não chamasse a atenção do cliente para o grave perigo que há no abuso e uso imoderado dos medicamentos e na necessidade de subordinar o seu emprego a verificação médica contínua e séria. Por isso, aquele que produz, vende ou distribui o medicamento deve possuir uma conveniente preparação científica, profissional e moral pois de outro modo ofende um direito social e natural do homem. É necessário que a Sociedade olhe a profissão farmacêutica sob este ângulo, que para bem se exercer deve pôr-se acima do interesse individual o bem da colectividade. Assim, e dado que não é moral privar-se o doente do medicamento por questões de natureza económica, compete ao Estado proteger a assistência farmacêutica através da organização sanitária, assegurando a sua disciplina e o seu desenvolvimento. Em face daqueles, que entram na farmácia a procurar a droga excitante para combater a fadiga, o calmante ou o tranquilizante para a insónia, o farmacêutico tem a responsabilidade e por vezes o direito de dizer, *não*, e colocar o interesse do seu cliente acima do seu interesse próprio, recusando-lhe o remédio que lhe pode ser nocivo.

Já ouvi dizer que o farmacêutico é um vendedor de esperança. Quando um cliente entra na farmácia ele traz uma esperança e não uma esperança banal ou secundária, mas a grande esperança de voltar à posse do bem mais precioso: a saúde.

Ser vendedor de esperança, não é sem dúvida tarefa fácil. É necessário altas qualidades morais, um sentido psicológico apurado, uma paciência quase evangélica e um coração generoso. O cliente pode ser um toxicómano, um ébrio, a criança à qual não se pode confiar a droga perigosa. Pode pressentir a receita falsa ou ter de corrigir a mal redigida. Em qualquer problema de natureza profissional o farmacêutico deve ter a liberdade de dizer *não*, um direito que lhe pertence como profissional independente, culto e moral; de dizer *não* ao próprio médico se o interesse do doente lhe parece pertinente; de dizer *não* ao cliente se julga que defende o seu interesse. As ocasiões em que ele poderá utilizar esse direito não serão frequentes. Na maioria dos casos, compete-lhe auxiliar e aconselhar o médico e o doente e colaborar com os serviços oficiais da previdência, da assistência e da saúde, em alta missão, tendo em vista, como disse o Prof. Lindstead, presidente da Federação Internacional Farmacêutica, *«proceder sempre sem correr o risco de perder o seu carácter humano»*.

Na Constituição da Organização Mundial de Saúde vem expresso que a saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não consiste apenas na ausência da doença ou da enfermidade. Os Governos têm responsabilidade pela saúde dos seus povos a qual só pode ser cumprida pelo estabelecimento de medidas sanitárias e sociais adequadas.

Considerado na justa medida o papel do farmacêutico, em face das perspectivas actuais, ao serviço do doente, com o seu coração e a sua inteligência e a função social que lhe está adstrita, com ele se deve contar ao proceder-se à planificação da cobertura sanitária das populações.

#### BIBLIOGRAFIA

Comunicações do Conselho Económico e Social das Nações Unidas e da Organização Mundial da Saúde.

# REVISTA PORTUGUESA DE FARMÁCIA

Director: M. MOURATO VERMELHO — Presidente da Direcção

Director-Adjunto: A. MARQUES LEAL

EDIÇÃO E PROPRIEDADE DE

SINDICATO NACIONAL DOS FARMACÊUTICOS — E SOCIEDADE FARMACÊUTICA LUSITANA  
(MEMBRO EFECTIVO DA «FÉDÉRATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE»)

SEDE: RUA DA SOCIEDADE FARMACÊUTICA, 18 — TEL. 4 1433 — LISBOA-1

CORPO REDACTORIAL:

J. ALMEIDA BALTAZAR; J. A. ALMEIDA RIBEIRO; J. ALVES DA SILVA; J. CARDOSO DO VALE; M. A. CONSTANTINO; A. CORREIA RALHA; M. CRISTIANO; J. DELGADO GUERREIRO; L. DUARTE RODRIGUES; A. FERNANDES COSTA; M. GRACA D'OLIVEIRA; J. J. IMAGINÁRIO MONTEIRO; A. LUPI NOGUEIRA; M. M. LUZ CLARA; A. MARQUES LEAL; A. MARTINS; A. MOZ TEIXEIRA; A. MOURATO VERMELHO; L. NOGUEIRA PRISTA; J. OLIVEIRA; M. R. ORNELAS; A. PALLA CARREIRO; E. PAQUETE; A. PEREIRA; A. PERQUILHAS TEIXEIRA; M. B. RAMOS LOPES; J. RAMOS MACHADO; H. SANTOS SILVA; L. SILVA CARVALHO; D. SILVA GOMES; C. SILVEIRA; L. SOUSA DIAS; J. F. VALE SERRANO

VOL. XII \* 1962

JULHO - SETEMBRO \* N.º 3

## TRABALHOS ORIGINAIS

### UM NOVO MÉTODO DE SÍNTESE DE ETIONAMIDA (\*)

J. M. NASCIMENTO

Eng. Químico

M. H. VENDA

Eng. Química

A etionamida (2-etilisonicotinotioamida) é um tuberculostático de síntese, que por não possuir resistência cruzada do «Mycobacterium tuberculosis» com a hidrazida do ácido isonicotínico e apresentar fraca toxicidade aguda e crónica, tem um lugar de destaque na terapêutica anti-tuberculosa nos casos em que se manifestam resistências bacilares aos medicamentos clássicos: hidrazida do ácido isonicotínico, estreptomina e ácido p-aminosalicílico.

A acção tuberculostática observa-se também nos outros membros da série das isonicotinotioamidas substituídas em posição 2 mas esta só se manifesta eficazmente «in vitro» até ao derivado n-amílico e «in vivo» até ao derivado n-butílico.

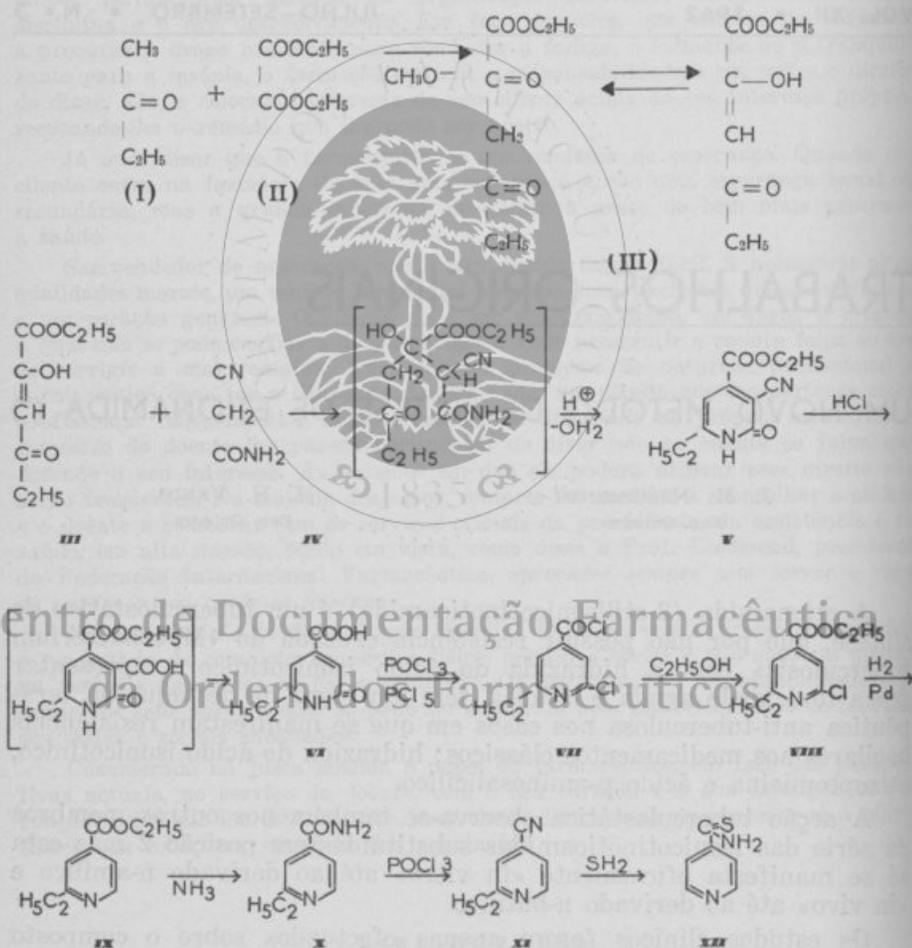
Os estudos clínicos foram apenas efectuados sobre o composto 2-etilo por ser esta a substância em que os efeitos tuberculostáticos, baixa toxicidade e facilidade de preparação, melhor se conjugavam.

(\*) Trabalho realizado no Laboratório Sanitas (Serviços de Química).

Um óbice bastante importante à divulgação da etionamida tem sido no entanto um custo elevado, que tem a sua razão no complicado método de síntese que serviu para a produção industrial das primeiras quantidades lançadas no comércio.

O aparecimento de novos métodos, que começam a ser introduzidos na prática industrial deverá modificar esta situação e tornar o seu uso mais generalizado.

A primeira síntese foi executada no cumprimento de um programa de preparação de derivados da isonicotinotioamida substituídos em posição 2 executado por LIBERMANN, RIST, GRUMBACH CALLS, MOYEUX, ROUAIX, segundo o esquema seguinte:



1) Preparação do propionilpiruvato de etilo (III) por condensação aldólica da metiletilcetona (I) com oxalato de etilo (II).

2) Formação do núcleo de piridona substituída em 2,4 e 5 (V) por reacção do propionilpiruvato de etilo (III) com a cianoacetamida (IV) segundo BARDHAN.

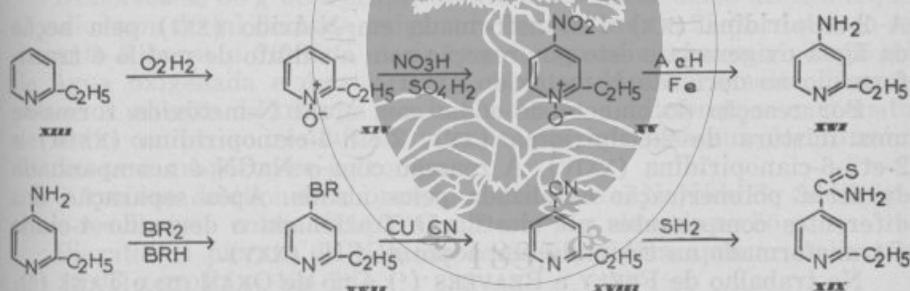
3) Eliminação do substituinte em 5 por saponificação ácida seguida de descarboxilação (VI).

4) Transformação do núcleo da piridona (VI) na piridina correspondente (IX) através de uma série de reacções que envolvem a formação de cloropiridina (VII) esterificação da função ácido (VIII) e hidrogenação desalogenante (IX).

5) Transformação do ester em amida (X), desta no nitrilo, (XI) e obtenção da tioamida por reacção com ácido sulfídrico (XII).

A despeito do carácter extremamente académico e complicado desta síntese este método foi introduzido na prática industrial o que arrastou a construção de instalações especialmente adaptadas a uma tecnologia complicada.

O interesse despertado pela etionamida originou o aparecimento de métodos mais simples que o primitivo. Segue-se cronologicamente ao de LIBERMANN e col. um processo estabelecido por N. F. KUTCHEROVA, R. M. KHOMUTOV, E. J. BUDOVSKII, V. P. EYDAKOV, N. K. KOCHETKOV, a partir da 2-etilpiridina segundo o esquema:



1) Activa-se a 2-etilpiridina (XIII) para as reacções de substituição electrófila transformando-a no N-óxido respectivo (XIV) por acção da água oxigenada.

2) O N-óxido é facilmente nitrável em posição 4 (XV) e o grupo nitro pela acção redutiva do hidrogénio nascente, obtido por reacção do ácido acético sobre limalha de ferro, é transformado em grupo amino (XVI) dando-se simultâneamente a redução da função N-óxido.

3) O grupo amino é transformado em derivado halogenado (XVII) por acção do bromo e do ácido bromídrico e este por sua vez é transformado em nitrilo (XVIII) por acção do cianeto de cobre.

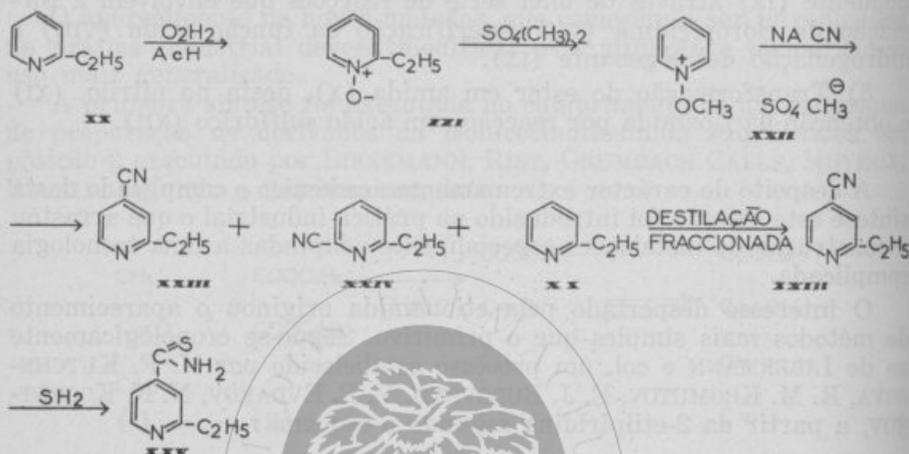
4) A transformação do nitrilo em tioamida (XIX) é efectuada pela acção do ácido sulfídrico como no processo de LIBERMANN.

O rendimento global deste processo é mais elevado que o de LIBERMANN e col., mas a realização de certas fases da síntese apresenta dificuldades tecnológicas consideráveis.

O processo agora estabelecido, baseado num reacção estudada recentemente por FEELY e BEAVERS (4), apresenta em relação aos

anteriores, vantagens de simplicidade nas instalações de fabricação e de um menor número de passos para execução da síntese.

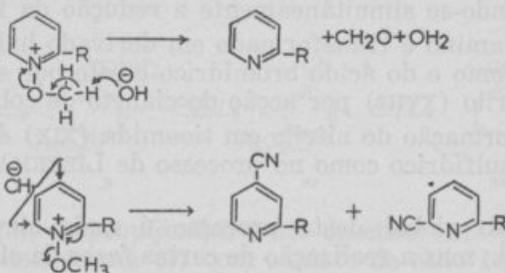
O caminho seguido é o indicado no esquema:



A 2-etilpiridina (XX) é transformada em N-óxido (XXI) pela acção da água oxigenada e este por reacção com o sulfato de metilo é transformado no derivado N-metóxido (XXII).

Por reacção do cianeto de sódio com o sal N-metóxido forma-se uma mistura de 2-etilpiridina (XX), 2-etil-4-cianopiridina (XXIII) e 2-etil-6-cianopiridina (XXIV). A reacção com o NaCN é acompanhada de certa polimerização catalizada pelos alcalis. Após separação dos diferentes componentes por destilação fracionada o derivado 4-ciano é transformado na tioamida por acção de  $SH_2$  (XXV).

No trabalho de FEELY e BEAVERS (4) e no de OKAMOTO e TANI (5), não se descreve qualquer caso em que por acção do cianeto sobre o metilsulfato de N-metóxido, se regenere a piridina original. Nenhum destes autores trabalhou porém com alquilpiridinas em que o radical alquilo fosse superior ao metilo, o que leva a pensar que os íões CN e OH entram em concorrência à medida que aumenta o peso molecular do grupo alquilo substituinte R, observando-se as duas reacções paralelas já admitidas por COATS e KATRITZSKY (6).



A identificação da 2-etilpiridina obtida na reacção do sulfato de N-metóxido com o NaCN, fez-se através da formação de picrato.

O derivado 6-ciano é transformado no ácido respectivo por hidrólise. Os espectros de UV do ácido e do seu complexo férrico apresentam máximos de absorção característicos dos ácidos alfa-piridino-carboxílicos (<sup>7</sup>). A descarboxilação deste ácido por destilação seca origina um composto volátil com cheiro a base piridínicas, que se identificou com a 2-etilpiridina, através da formação do picrato e do picrato do seu N-óxido.

A partir do derivado 6-ciano preparou-se uma tioamida que tem solubilidade mais pronunciada nos solventes orgânicos que o seu isômero em C-4 e que por hidrólise alcalina originou o mesmo ácido que se obteve por hidrólise do nitrilo em posição 6.

## PARTE EXPERIMENTAL

NOTA: Os p.f. foram determinados em bloco de Kofler e não foram corrigidos.

### N-óxido de 2-etilpiridina

Dissolveu-se 53 g de 2-etilpiridina em 300 ml de ácido acético a que se adicionou 50 ml de água oxigenada concentrada a 35 %. Aqueceu-se durante 3 horas a 70-80°C. Após esse tempo adicionou-se ainda 35 ml de água oxigenada e deixou-se em repouso durante a noite. Evaporou-se à pressão da trompa e a banho-maria e adicionou-se carbonato de sódio anidro ao resíduo. A mistura suspendeu-se em clorofórmio, filtrou-se e evaporou-se à trompa.

O resíduo destilou-se a pressão reduzida e o N-óxido de 2-etilpiridina recolheu-se entre 103-105°C a 3 mm Hg obtendo-se 55 g.

Picrato: O picrato de N-óxido de 2-etilpiridina após cristalização em álcool tem Pf = 134-7°C.

### Metilsulfato de N-metoxi-2-etil-piridina

Adicionou-se lentamente a 50 g de N-óxido de 2-etilpiridina 50 g do sulfato de metilo de modo a que a temperatura não subisse acima de 80°C. Após adição, aqueceu-se a banho-maria durante 2 horas. A substância obtida é um líquido com consistência xaroposa que não se conseguiu cristalizar.

### 2-etil-4-ciano-piridina

A 160 ml duma solução contendo 56 g de cianeto de sódio adicionou-se 100 g de metilsulfato de N-metoxi-2-etilpiridina, arrefecendo de maneira a que a elevação de temperatura não ultrapasse os 60°C. Logo que a adição de cianeto terminou, adicionou-se acetato de etilo e extraíram-se da solução os produtos orgânicos. Lavou-se ainda uma vez com água, secou-se o acetato de etilo e destilou-se à pressão de 30 mm Hg, com fracionamento grosseiro em coluna de Vigreux. Após eliminação do acetato de etilo, recolheu-se à pressão atmosférica uma fracção entre 100-120°C, que se verificou ser constituída principalmente por 2-etilpi-

ridina através da obtenção do picrato e determinação do ponto de fusão misto com o picrato de amostra genuína.

A fracção passando à pressão de 30 mm Hg entre 120-140°C era constituída quase totalmente pela mistura de ciano-2-etilpiridinas.

A fracção passando entre 120-140°C à pressão de 30 mm Hg foi de novo submetida ao fraccionamento em coluna de Vigreux, obtendo-se uma fracção destilando entre 110-130°C (5,6 g) constituída principalmente por 4-ciano-2-etilpiridina e uma fracção destilando entre 130-140°C constituída por 6-ciano-2-etilpiridina (10,2 g).

#### Hidrólise alcalina de 6-ciano-2-etilpiridina

Dissolveram-se 10 g de substância em 20 ml de NaOH 4n e aqueceu-se a refluxo durante 3 horas. Após este tempo arrefeceu-se e adicionou-se ácido clorídrico conc. até pH7, e em seguida concentrou-se a solução a banho-maria e a pressão reduzida. O ácido precipitou da solução, filtrou-se e concentrou-se de novo até um pequeno volume o que levou à formação de mais precipitado cristalino. As diferentes fracções de ácido foram reunidas e recristalizadas em água-acetona obtendo-se uma substância de Pf = 294-6°C.

#### Estabelecimento da fórmula da 6-ciano-2-etilpiridina

##### Análise elementar



Encontrado

C=73,02 %

H= 6,72 %

Calculado

C=72,6 %

H= 6,1 %

#### Espectro do ácido 2-etil-6-piridinocarboxílico

Os espectros foram efectuados num aparelho Beckmann D.U.

A absorção foi medida numa solução a 1% em água-metanol 10% (v/v). Observou-se um ponto de inflexão da curva a  $\lambda = 217 \text{ m}\mu$  e um máximo de absorção a  $\lambda \text{ max} = 272 \text{ m}\mu$   $E^{1\text{cm}} = 352$ .

O espectro do ácido 2-picolínico observado nas mesmas condições mostra um máximo a  $\lambda \text{ max} = 217 \text{ m}\mu$   $E^{1\text{cm}} = 352$  e um outro a  $\lambda \text{ max} = 274 \text{ m}\mu$   $E^{1\text{cm}} = 430$ .

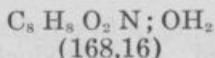
#### Espectro do complexo férrico do ácido

Adicionou-se 0,8 ml duma solução 0,174 molar de sal de Mohr recentemente preparada a uma solução de 10 mg de ácido em 10 ml de solução de água com 10% metanol (v/v). Observou-se um máximo a  $\lambda \text{ max} = 320 \text{ m}\mu$   $E^{1\text{cm}} = 1.156$  e outro máximo a  $\lambda \text{ max} = 399 \text{ m}\mu$

$E^{1\text{cm}} = 1.040$ .

1 %

## Análise elementar



Encontrado	Calculado
H= 5,24 %	H= 5,96 %
C=55,04 %	C=56,09 %
N= 8,42 %	N= 8,29 %

## Descarboxilação do ácido 2-etil-6-piridinocarboxílico

49 g de ácido de vários ensaios de hidrólise foram submetidos à destilação seca à pressão ambiente. O destilado apresentava forte cheiro a bases piridínicas. Dissolveu-se em éter secou-se sobre sulfato de sódio e filtrou-se. Evaporou-se o éter e obteve-se um resíduo de 6,29 g.

A substância submeteu-se à destilação recolhendo-se 0,70 g entre 100-120°C, 1,22 g entre 120-140°C e 1,69 g a 145-50°C.

O picrato de fracção recolhida entre 145-50°C tem Pf = 105-8°C.

O picrato de uma amostra genuína de 2-etilpiridina tem Pf = 104-6°C.

O Pf misto observado foi de 105-8°C.

Da fracção recolhida entre 145-50°C retiraram-se 500 mg de substância que foram transformados no seu derivado N-óxido, obtendo-se um resíduo de 470 mg.

O picrato de N-óxido após recristalização apresentou Pf = 134-7°C.

O Pf misto com amostra genuína de 2-etil N-oxidopiridina não deu depressão.

## Tioamida do ácido 2-etilisonicotínico

Dissolveu-se 15 g de 4-ciano-2-etilpiridina em 40 ml de álcool a que se juntou 4 ml de trietanolamina fazendo-se passar em seguida uma corrente de ácido sulfídrico seco. Após algum tempo, arrefeceu-se a solução num banho gelado e continuou-se a passagem de ácido sulfídrico. A etionamida cristalizou pouco a pouco acabando por cristalizar em massa. Os cristais lavaram-se com água ligeiramente acidulada, com éter, para separar vestígios de 2-etilpiridina e recristalizaram-se de novo em álcool obtendo-se 10,2 g de substância com Pf = 164-7°C.

## Tioamida do ácido 2-etil-6-piridinocarboxílico

Procedeu-se como para a preparação da tioamida em posição 4. Após algumas horas de passagem de ácido sulfídrico seco, evaporou-se parcialmente o álcool e adicionou-se água à mistura. Extraiu-se com éter etílico, evaporou-se o solvente e cristalizou-se a tioamida de Pf = 78-79°C.

A tioamida submetida a hidrólise alcalina com NaOH 10 % durante 3 horas originou o mesmo ácido 2-etil-6-piridinocarboxílico que se obteve por hidrólise do nitrilo em posição 6.

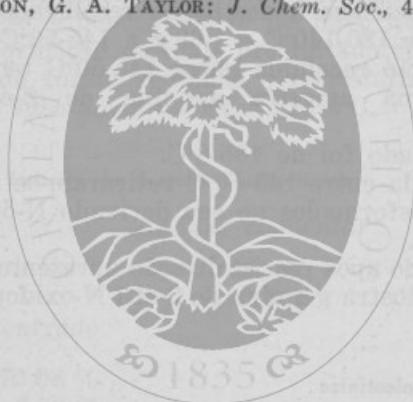
As análises elementares foram efectuadas por E. THOMMEN (Lab. Química Orgânica — Universidade Basileia).

## SUMMARY

A new synthetic route to alfa-ethylisonicotinoylthioamide from 2-ethylpyridine is described. A by-product isolated in the synthesis was identified as 2-ethyl-6-cyanopyridine.

## BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) D. LIBERMANN, N. RIST, F. GRUMBACH et S. CALS: *Bull. Chim. e Biol.*, 1195-1200 (1957).  
 (<sup>2</sup>) LIBERMANN, N. RIST, F. GRUMBACH, S. CALS, M. MOYEU, A. ROUAIX: *Bull. Soc. Chim.*, 687-694 (1958).  
 (<sup>3</sup>) N. F. KUCHEROVA, R. M. KHOMUTOV; E. J. BUDOVSKII, V. P. EVDAKOV, N. K. KOCHETKOV: *Zhur. Obschei Khim*, 29, 915-9 (1959).  
 (<sup>4</sup>) W. E. FEELY, M. BEAVERS: *J. Am. Chem. Soc.*, 4004-4007 (1959).  
 (<sup>5</sup>) T. OKAMOTO, H. TANI: *Chem. and Pharm. Bulletin*, 7, 130 (1959).  
 (<sup>6</sup>) N. A. COATS, R. KATRITZKY: *J. Chem. Soc.*, 24, 1836-1837 (1959).  
 (<sup>7</sup>) R. M. ACHESON, G. A. TAYLOR: *J. Chem. Soc.*, 4140-4141 (1959).



Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

## ESTUDO DE ALOE VERA L., DE CABO VERDE (\*)

A. PEREIRA JR., J. PEREIRA e M.<sup>a</sup> MANUELA A. PEREIRA

## 1. ISOLAMENTO DA BARBALOÍNA. SUA IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA DO INFRA-VERMELHO

A espécie *Aloe vera* L. encontra-se largamente disseminada na província de Cabo Verde, onde esta liliácea é conhecida, tal como na Metrópole, pelo nome vulgar de «babosa» e cujo suco, misturado com leite, é usado como purgante. Também ali se servem das folhas, depois de aquecidas na cinza, para combater o reumatismo e tratar as contusões (1).

Embora se saiba desde há milénios que o aloés constitui um afamado medicamento purgativo e que a espécie *Aloe vera* L. que vegeta nas Antilhas, produz conhecidos tipos daquele fármaco, vulgarmente designados por aloés das Barbadas e aloés de Curaçau, não consta que se tivesse já obtido aloés em Cabo Verde.

Foi por isso que o Chefe da Missão de Estudos Agronómicos do Ultramar, Senhor Eng.<sup>o</sup> Lains e Silva, ordenou que se procedesse aos estudos necessários para esse objectivo.

Por nossa indicação, o Sr. Eng.<sup>o</sup> Mateus Nunes, chefe da Brigada que actua naquele Arquipélago, promoveu ali a obtenção de duas amostras de aloés. Uma era constituída pelo suco concreto de folhas seccionadas e a outra por um extracto seco obtido por decocção da polpa de folhas.

O facto de o suco possuir propriedades purgativas, fazia prever que nas plantas que crescem em Cabo Verde, tal como sucede nas que vegetam nas Antilhas, se encontrassem substâncias antraquinónicas. Na realidade, isso foi confirmado pela reacção de BORNTÄGER.

Importava, agora, isolar e identificar essas substâncias antraquinónicas. Para isso procedemos a um tratamento com água ligeiramente acidificada com  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Ficou insolubilizada a parte resinosa que eliminámos por filtração.

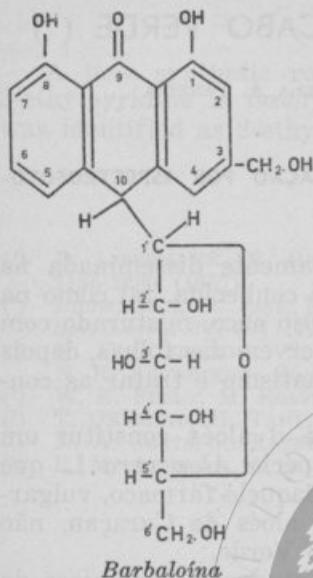
O extracto aquoso foi concentrado até pequeno volume.

Mantendo o concentrado na geleira durante 24 horas, formaram-se cristais que separámos por filtração. Seguidamente foram recristalizados várias vezes em metanol, obtendo-se assim, finalmente, uma substância cristalina, de cor amarelo-citrino que funde a 145-146°, valor descrito para a barbaloína (4, 6, 7).

A substância isolada é solúvel em água, metanol, etanol e um tanto no n-butanol. É quase insolúvel no éter sulfúrico, clorofórmio e acetato de etilo.

Um soluto aquoso, adicionado de soluto saturado de borax e observado à luz U. V., apresenta intensa coloração amarelo-citrino.

(\*) Trabalho apresentado nas I Jornadas Farmacêuticas Portuguesas, Porto, 31 de Maio a 3 de Junho de 1962.



binosido da aloemodina, as mais recentes investigações<sup>(2, 6)</sup> levaram à conclusão de que ela é 10 (1',5'-anidroglicosil)-1,8-dihidroxi-3-hidroximetil-9-antrona.

## 2. MATERIAL

Os nossos estudos incidiram, como dissemos, sobre duas amostras (n.<sup>os</sup> 1 e 2) cujos modos de obtenção e caracteres passamos a descrever:

*Amostra n.º 1* — Foi obtida por incisões em folhas, previamente seccionadas perto do seu ponto de inserção e dispostas obliquamente, donde escorreu o suco que foi seco a b. m., apresentando-se então sob a forma de pequenos pedaços facilmente reduzíveis a pó amarelo-avermelhado com cheiro misto de mirra e iodo e ainda um tanto parecido com o do açafraão.

*Amostra n.º 2* — Produto da trituração das folhas, tratando depois a polpa com água, primeiro a frio e, em seguida, à ebulição. Coado o decocto, foi feita a evaporação até secura. Resultou um produto castanho-escuro, opaco, de fractura vítrea, um tanto higroscópico, com cheiro misto de mirra, iodo e açafraão, menos intenso que o da amostra n.º 1.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Barbaloina

#### 3.1.1. Obtenção

Apresentamos a técnica seguida e os resultados obtidos com a amostra n.º 1.

Para confirmar que a substância isolada é a barbaloina, procedemos a ensaios comparativos com esta. Para isso, recristalizámos várias vezes em metanol barbaloina do comércio até obter o ponto de fusão 145-146°.

A mistura das duas substâncias fundiu a igual temperatura.

Por outro lado, os espectros no infra-vermelho resultaram sobreponíveis.

Tudo isto levou-nos a concluir que as folhas da espécie *Aloe vera* L., de Cabo Verde, contêm *barbaloina* e em quantidade suficiente para que o aloés delas obtido possa ser utilizado para fins farmacêuticos, independentemente de outras aplicações que venham a ser dadas à polpa total das folhas, à mucilagem e a outros componentes<sup>(5)</sup>.

Embora durante muito tempo se tenha considerado a barbaloina como um d-ara-

Tratámos com 50 ml de água acidificada (1 % de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ), 5 g da amostra, depois de previamente pulverizada, fervendo durante 1 minuto. Deixámos esfriar e em repouso durante 2 horas para sedimentação da parte resinosa. O líquido sobrenadante foi decantado e filtrado por talco, lavando o resíduo com 10 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  diluído a 1 %. Procedemos a evaporação, à pressão de 20 mm Hg e em b. m. a 45°, até reduzir o volume a 7 ml aproximadamente. Resultou um extracto límpido de consistência xaroposa.

Após algumas horas no frigorífico, começaram a aparecer agulhas compridas e finas. Passadas 24 horas sempre no frigorífico, separámos, por filtração, o resíduo cristalizado impuro.

Depois de seco, pesou 1,055 g.

### 3.1.2. Purificação

700 mg da substância cristalizada impura foram tratados com 4 ml de metanol ebuliente. Ficou um resíduo esbranquiçado (75 mg) constituído por impurezas de natureza péctica (\*).

A solução de cor acastanhada, foi concentrada até cerca de 1,5 ml e colocada na geleira durante 14 horas. Apresentou então cristais prismáticos amarelos que foram separados por filtração e pesaram 170 mg.

Para mais elevada purificação, estes cristais foram tratados com 10 ml de metanol ebuliente. Ficou um resíduo esbranquiçado (15 mg) idêntico ao que tinha resultado da primeira recristalização ou seja de natureza pectínica.

Depois de concentrar o filtrado até cerca de 1,5 ml, deixámo-lo em repouso, no frigorífico, durante uma noite. Apresentou então uma pequena quantidade de substância pulverulenta que, retirada por filtração e seca, pesou 2 mg e mostrou ser também de natureza péctica.

Concentrámos este último filtrado até cerca de 1 ml e colocámo-lo novamente no frigorífico durante 8 horas. Nessa altura notámos que por toda a massa líquida havia cristais que separámos, lavámos com metanol e secámos. Obtivemos, assim, 65 mg de um pó amarelo-citrino, constituído por cristais prismáticos aglomerados que fundiram a 145-146° (\*\*). (câmara de Koffler).

### 3.1.3 Caracterização em luz U.V.

5 mg de substância, dissolvidos em 0,5 ml de água destilada, adicionados de 1 ml de solução de borax a 5 % e observados em câmara de U.V., apresentam intensa fluorescência amarelo-citrino.

(\*) Este resíduo era insolúvel em metanol, etanol, éter sulfúrico e outros dissolventes orgânicos; solúvel em água e não reduzia o licor de FHELING. Dissolvido em CIH a 5 %, mantido em ebulição durante 15 minutos e neutralizado depois com (OH)Na, reduziu rápida e intensamente aquele licor.

(\*\*) A partir de 130° mudou de cor, passando primeiro a alaranjado e depois a castanho claro.

### 3.2. Barbaloína do comércio

#### 3.2.1. Purificação

500 mg de barbaloína do comércio foram submetidos a duas recristalizações em metanol. Obtivemos 81 mg de cristais prismáticos, amarelos que fundiram, em câmara de Koffler, a 145-146° (\*\*\*) .

O p. f. da mistura destes com os que havíamos isolado anteriormente, manteve-se em 145-146°.

#### 3.2.2. Caracterização em luz U.V.

Procedendo como no caso da substância isolada do aloés de Cabo Verde, notámos igualmente uma intensa fluorescência amarelo-citrino.

### 3.3 Exames espectrofotométricos

Para confirmação da identidade da substância isolada por nós, submetêmo-la a exame espectrofotométrico em infra-vermelho, comparativamente com a barbaloína previamente recristalizada.

Utilizámos um espectrofotómetro UNICAM SP 100. Para os exames, as substâncias foram suspensas em nujol.

Como pode observar-se nos Gráficos I, II e III, os espectros são sobreponíveis e, portanto, as substâncias são idênticas.

Por outro lado, estes espectros são semelhantes aos que foram publicados por BAUMGARTNER e LEUPIN (2). Tal como encontraram estes autores, também nos espectros por nós obtidos aparece em 1640 cm-1 uma bem nítida absorção correspondente ao grupo C-O da quinona, embora anteriormente HAY e HAYNES (3) a tenham referido em 1631 cm-1.

## Centro de Documentação Farmacêutica

### 4. CONCLUSÕES

As folhas da espécie *Aloe vera* L. que vegeta espontaneamente em Cabo Verde, são susceptíveis de fornecer, por incisões, um suco que, depois de seco, tem as características dos aloés das Antilhas, vulgarmente conhecidos por aloés das Barbadas e de Curaçau.

Também das referidas folhas se pode obter, por decocção, um produto com as características de aloés opaco.

De amostras destes dois tipos foi possível isolar, em forma pura e cristalizada, a barbaloína que foi identificada pelo p. f. e pelo espectro de infra-vermelho. A quantidade existente no suco concreto permite o seu emprego como medicamento.

(\*\*\*) Durante o aquecimento comportaram-se semelhantemente aos cristais isolados do aloés de Cabo Verde.



FIG. 1 — Barbaloina isolada de Aloe vera L. de Cabo Verde.  
Espectro de absorção no infra-vermelho, em nujol.



FIG. 2.—*Barbaloina do comércio, recristalizada em metanol. Espectro de absorção no infra-vermelho, em nujol.*

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

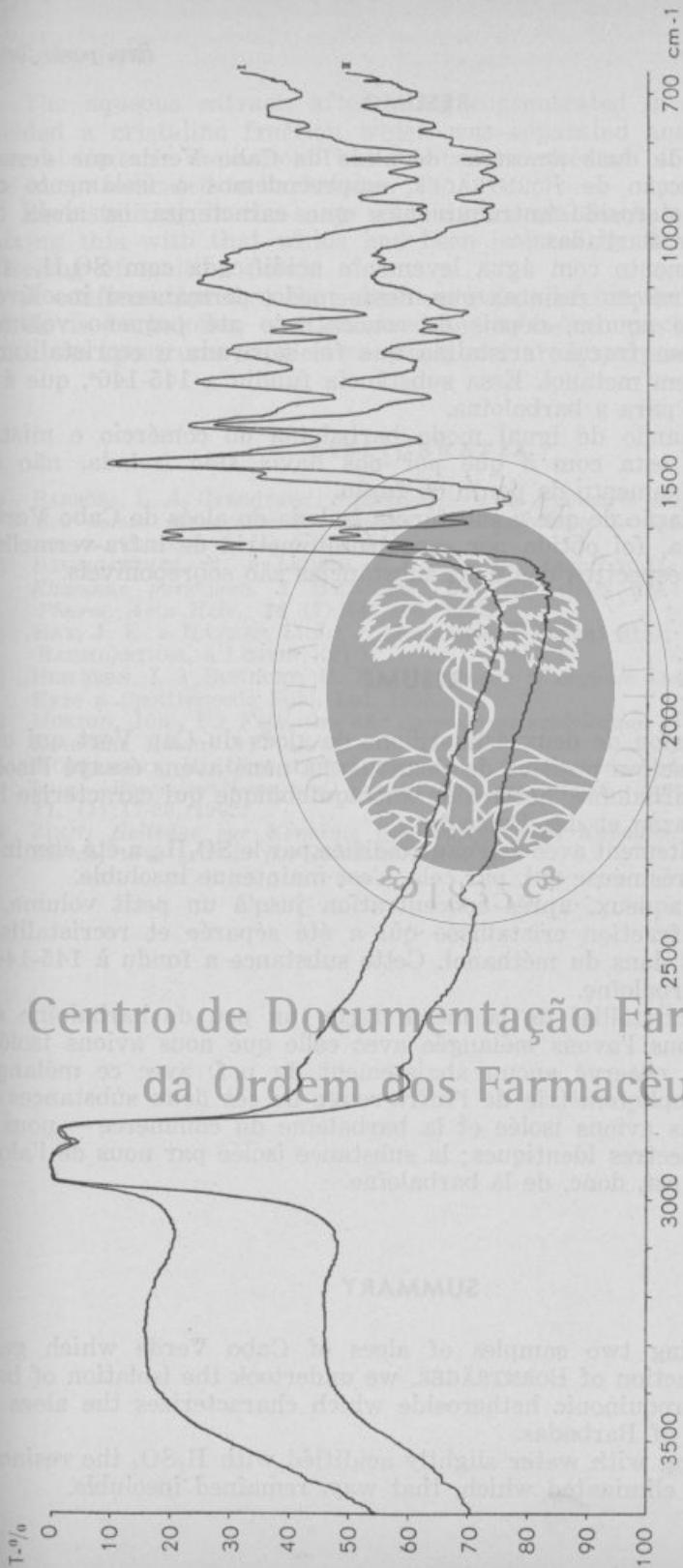


FIG. 3.—Espectros de absorção no infra-vermelho, em metanol.

I—Barbaloina isolada de Aloe Vera L. de Cabo Verde.

II—Barbaloina do comércio, recristalizada em metanol.

Centro de Documentação Farmacéutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

## RESUMO

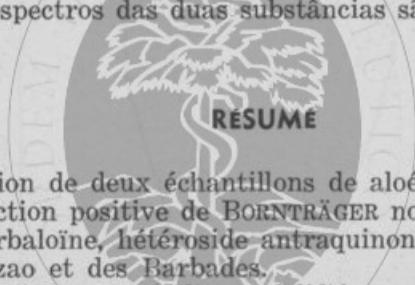
Dispondo de duas amostras de aloés de Cabo Verde que deram positiva a recção de BORNRÄGER, empreendemos o isolamento da barbaloína, heterosido antraquinónico que caracteriza os aloés do Curaçau e das Barbadas.

Por tratamento com água levemente acidificada com  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , foi eliminada a fracção resinosa que, desse modo, permaneceu insolúvel.

O extracto aquoso, depois de concentrado até pequeno volume, abandonou uma fracção cristalina que foi separada e recristalizada várias vezes em metanol. Essa substância fundiu a 145-146°, que é o p. f. indicado para a barbaloína.

Recristalizando de igual modo barbaloína do comércio e misturando depois esta com a que por nós havia sido isolada, não se observou abaixamento do ponto de fusão.

A confirmação de que a substância isolada do aloés de Cabo Verde é a barbaloína, foi obtida por espectrofotometria de infra-vermelho, porquanto os espectros das duas substâncias são sobreponíveis.



En possession de deux échantillons de aloés du Cap Vert qui ont donné une réaction positive de BORNRÄGER nous avons essayé l'isolement de la barbaloïne, hétéroside antraquinonique qui caractérise les aloés du Curaçao et des Barbades.

Par le traitement avec de l'eau acidifiée par le  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , a été éliminée une fraction résineuse qui, par cela, s'est maintenue insoluble.

L'extract aqueux, après concentration jusqu'à un petit volume, a produit une fraction cristallisée qui a été séparée et recristallisée plusieurs fois dans du méthanol. Cette substance a fondu à 145-146°, p. f. de la barbaloïne.

Ayant recristallisé de la même façon un peu de barbaloïne du commerce, nous l'avons mélangée avec celle que nous avons isolée; nous n'avons observé aucun abaissement du p. f. avec ce mélange.

La spectrophotométrie de l'infra-rouge de ces deux substances — celle que nous avons isolée et la barbaloïne du commerce — nous a fourni des spectres identiques; la substance isolée par nous de l'aloés du Cap Vert est, donc, de la barbaloïne.

## SUMMARY

Determining two samples of aloes of Cabo Verde which gave a positive reaction of BORNRÄGER, we undertook the isolation of barbaloïne, anthroquinonic hetheroside which characterizes the aloes of Curazau and of Barbadas.

By treating with water slightly acidified with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  the resinous fraction was eliminated which, that way, remained insoluble.

The aqueous extract, after being concentrated in small volume, yielded a cristaline fraction which was separated and recrystallized several times in methanol. That substance melted at 145-146° which is the m. p. indicated to barbaloine.

Recrystallizing in the same way, commercial barbaloine and after, mixing this with that which had been isolated by us, there was no lowering of melting point.

A confirmation that the substance isolated from the aloes of Cabo Verde is barbaloine, was obtained by infra-red spectrophotometry, since the spectrums of the two substances are superposed.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) BARBOSA, L. A. Grandvaux: *Subsídios para um dicionário utilitário e glossário dos nomes vernáculos das plantas do arquipélago de Cabo Verde*. Estud. agron. (Lisboa) 2 (1):1-57, 1961.
- (<sup>2</sup>) BAUMGARTNER, R. & LEUPIN, K.: *Über die Inhaltsstoffe der Rinde von Rhamnus purshiana. 2. Mitteilung. Der Nachweis des 11-Desoxyaloins*. Pharm. Acta Helv., 36 (7):445-460, 1961.
- (<sup>3</sup>) HAY, J. E. & HAYNES, L. J.: *J. Chem. Soc. (London)* 3141, 1956 (citado por BAUMGARTNER, e LEUPIN, (2) ).
- (<sup>4</sup>) HEILBRON, I. & BUNBURY, H. M.: *Dictionary of organic compounds*. London. Eyre & Spottiswoode Publ. Ltd. 1953.
- (<sup>5</sup>) MORTON, Júlia F.: *Folk uses and commercial exploitation of ALOE leaf pulp*. Economic Botany 15 (4):311-319, 1961.
- (<sup>6</sup>) MÜHLEMANN, H.: *Über Anthrachinone und Anthrachinonglykoside. 15. Mitteilung — Partialsynthese und Konstitution des Aloins*. Pharm. Acta. Helv., 27, (1):17-26, 1952.
- (<sup>7</sup>) ZINN: *Beiträge zur Kenntnis von Kapaloe und Kapaloin*. Diss. E. T. H. Zürich, 1945 [citado por MÜHLEMANN (<sup>6</sup>)].

Centro de Documentação Farmacêutica  
da Ordem dos Farmacêuticos

# IDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DO CLORDIAZEPÓXIDO E SEUS PREPARADOS GALÉNICOS (\*)

A. MARQUES LEAL e M. MANUELA LEITE INÁCIO

Entre os psicofármacos introduzidos ultimamente na clínica, ocupa lugar de relevo, pela grande actividade e quase ausência de toxicidade, o clordiazepóxido — derivado da benzodiazepina — sintetizado pela primeira vez por investigadores suíços (1).

Quimicamente é o cloridrato de 4-óxido-7-cloro-2-metilamino-5-fenil-3-H-1,4-benzodiazepina e tem sido empregado na clínica como tranquilizante e anti-depressivo.

O interesse terapêutico deste fármaco levou-nos a pensar na sua industrialização, para o que tivemos de estudar o seu ensaio de pureza, a preparação de formas orais e sua conservação.

Na data em que iniciámos esses ensaios (Maio 1961), apenas possuíamos elementos sobre o ponto de fusão (1, 2), solubilidades, uma reacção de identificação com o iodo em meio ácido (2) e as possibilidades de dosagem do cloro e do azoto total (2).

Posteriormente, e até agora, pouco mais foi publicado (3): uma anidrotitulimetria com ácido perclórico em presença de dioxano e uma determinação colorimétrica baseada na obtenção de coloração alaranjada com a fenil-hidrazina, em meio ácido e a quente.

Os ensaios que adiante referiremos — e constituem a parte experimental desta nota — dizem respeito, sobretudo, a reacções de identificação do cloridrato de clordiazepóxido, estudo do espectro no U.V. e de alguns métodos de doseamento (anidrovolumetria e gravimetria com sal de Reinecke) e «controle» dos comprimidos e cápsulas (identificação e dosagem).

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1) Propriedades físico-químicas

O cloridrato de clordiazepóxido é um pó branco, microcristalino, alterável à luz, quase inodoro, bastante amargo, de ponto de fusão 214-218°, com decomposição (aquecimento rápido; imersão do tubo no banho a  $\pm 200^\circ$ ). Os números referidos na literatura são: 210-213°, 212-213° e 212-218° (1, 2, 3). Não conseguimos produto de ponto de fusão mais elevado por recristalização (solução no álcool quente e diluição com éter). A base teria ponto de fusão cerca de 236° (1).

É muito solúvel na água (com reacção ácida à heliantina) e no álcool, menos no clorofórmio, pouco na acetona e insolúvel no éter (2, 3). Cora levemente de amarelo, a frio, pelos ácidos clorídrico, sulfúrico e azótico (reacções efectuadas sobre 0,1 g do pó e 5 ml do

(\*) Trabalho realizado no Laboratório da Companhia Portuguesa Higiene (Secção de Verificação).

reagente) e cora de amarelo dourado pela mistura de  $\text{NO}_3\text{H} + \text{SO}_4\text{H}_2$  (0,1 g e 2 ml da mistura, em partes iguais).

A solução a 1 % precipita pelos reagentes gerais dos alcalóides, nomeadamente o ácido silicotúngstico (pp. branco, imediato) reagente de Nessler (pp. branco-amarelado, imediato, bastante abundante), água de bromo (pp. amarelo claro, pouco abundante, mas imediato) cloreto mercúrio (pp. branco caseoso e pouco denso) ferricianeto e ferrocianeto de potássio (pp. brancos, ao fim de 15 m) sal de Reinecke (pp. rosado, imediato e abundante). Com o iodo, quer em meio clorídrico quer em água, obtêm-se pp imediatos, acastanhados, de aspecto diferente. Todos estes precipitados foram obtidos sobre 5 ml da solução a 1 % e cerca de 2 ml dos reagentes; observados ao microscópio não mostraram interesse analítico especial.

Tem interesse particular a obtenção do picrato que tem ponto de fusão definido (cerca de  $160^\circ$ ) e a obtenção de precipitado microcristalino, que se forma lentamente (cerca de 15 m), com a solução a 20 % de iodeto de potássio; ao microscópio observam-se maclas em rosetas, ou agulhas isoladas, compridas, já visíveis com pequena ampliação.

Em solução a 0,5 mg % (em água, ou em ácido clorídrico 0,1 N) apresenta espectros no U.V., característicos e um pouco diferentes (fig. I); tem mais interesse o espectro em meio ácido, com densidade

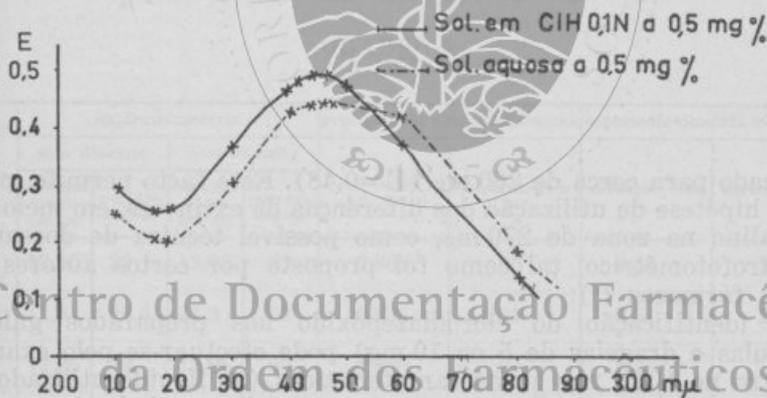


FIG. 1

óptica mais elevada na zona do máximo, verificando-se no entanto a lei de Beer em quaisquer destes dissolventes (fig II). O mínimo verifica-se, tanto num caso como noutro, a 217-219  $\text{m}\mu$  sendo para a água  $E=0,20$  e para o ácido  $E=0,25$ .

Quanto ao máximo (que é mais largo na água) verifica-se a 244-246  $\text{m}\mu$  ( $E=0,445$ ); no ácido é mais pronunciado, a 245  $\text{m}\mu$  ( $E=0,49$ ;  $E^1\% = 980$ ) (5).

Encontrámos uma relação constante  $\frac{E_{245}}{E_{218}}$ , que para o espectro

em água é igual a 2,1 a 2,3 e para o espectro em ácido clorídrico 0,1 N é igual a 1,9-2,0, relações estas que podem constituir um critério de avaliação de pureza. Experimentou-se ainda o espectro em OHNa 0,01 N verificando-se que não tem um interesse especial; observa-se um mínimo na mesma zona (217-219  $m\mu$ ) estando apenas o máximo

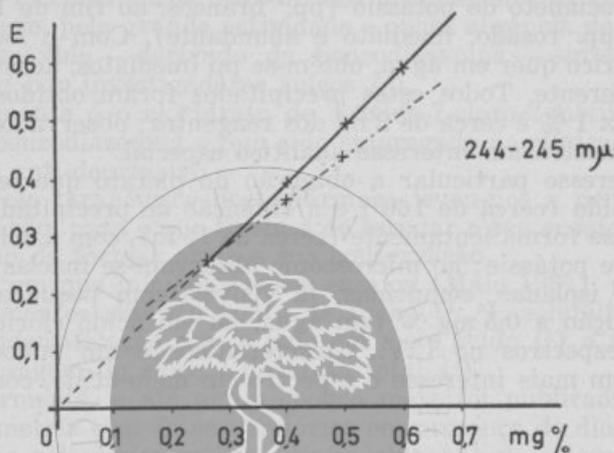


Fig. 2

deslocado para cerca de 260  $m\mu$  ( $E=0,48$ ). Este facto permite, porém, pôr a hipótese de utilização das diferenças de extinções, em meio ácido e alcalino na zona de 270  $m\mu$ , como possível técnica de doseamento espectrofotométrico, tal como foi proposto por certos autores para outros fármacos (\*).

A identificação do clordiazepóxido nos preparados galénicos (cápsulas e drageias de 5 ou 10 mg) pode efectuar-se pelo exame do espectro no U.V., nas zonas características (no líquido utilizado para o ensaio quantitativo que adiante se refere), ou ainda do modo seguinte: o pó correspondente a 100 mg de substância activa (no caso das drageias convém eliminar a camada corada pelo processo habitual de lavagem com água) é agitado durante alguns minutos com 10 ml de água; no filtrado, efectuar as reacções com sal de Reinecke e com o iodeto de potássio.

## 2) Métodos de doseamento

Nos ensaios preliminares, experimentámos diferentes tipos de técnicas: volumétricas (iodometria, argentimetria e anidrovolumetria) espectrofotometria (no U.V. em meio clorídrico) e ponderal (baseada na reacção de precipitação com o sal de Reinecke).

A iodometria indirecta foi ensaiada de modo semelhante ao método descrito na F.P. para o sulfatiazol, operando sobre quantidades vizinhas de 0,25 g; nas condições ensaiadas por nós, o método mostrou-se irregular, mas julgamos possível a afinação duma técnica iodométrica, após estudo, sistematizado, do tempo de contacto e das condições de precipitação.

A argentimetria indirecta foi ensaiada à maneira habitual, em presença de nitrobenzeno, sob 0,25 g do fármaco; deu-nos também resultados irregulares, se bem que admitamos a possibilidade de modificação satisfatória.

Com melhor êxito experimentámos a titulação em meio anidro, do modo seguinte: dissolver 0,4 g do produto em 40 ml de ácido acético p.a, adicionar 5 ml de solução acética de acetato mercúrico a 5 % e II gotas de solução acética de violeta de metilo; adicionar ácido perclórico 0,1 N até viragem ao verde. Fazer um ensaio a branco nas mesmas condições. A percentagem é dada multiplicando a diferença do  $\text{ClO}_4\text{H}$  0,1 N gasto nos dois ensaios por 8,405 (1 ml de ácido <> 33,62 mg do produto).

Os resultados oscilaram entre 96,6 e 99 %. A técnica posteriormente publicada (3), com ácido acético e dioxano e que atrás nos referimos, foi experimentada com resultados sensivelmente análogos (Quadro I).

QUADRO I

amostra	anidrovolumetria				precipitação com sal Reinecke		espectrofotometria no U. V.	
	sem dioxano		com dioxano		peso do pp. em g	percentagem	extinção lida	percentagem
	volume gasto em ml	percentagem	volume gasto em ml	percentagem				
1	12,05	99	12,05	99	0,868	98	0,49	100
2	11,8	96,6	11,8	97	0,896	101	0,51	104
3	12,05	99	12,05	99	0,880	99	0,46+	94
4	11,7	98,9	—	—	0,899	101,5	0,46+	94
5	11,6	97,5	—	—	0,880	99	—	—

A técnica ponderal com o sal de Reinecke deu-nos resultados satisfatórios (98-101 %) como elemento de avaliação de pureza, operando do seguinte modo (5): dissolver 0,050 g em 50 ml de água, juntar 5 ml de solução recente (saturada a frio) de sal de Reinecke, agitar e deixar separar o precipitado dum dia para o outro; filtrar por cadinho de vidro poroso, tarado ( $G_3$  ou  $G_4$ ), lavar o precipitado com  $3 \times 5$  ml de água e secar a 60-70°, até peso constante. Calcular a percentagem multiplicando o peso do pp.º por 1131,2 (1 g do pp <> 0,5656 g de clordiazepóxido).

Esta técnica foi ensaiada também nos preparados galénicos, mas os resultados obtidos foram de  $\pm 50\%$  do teórico talvez por adsorção da substância activa aos adjuvantes.

Para a espectrofotometria no U.V., efectuámos os ensaios a 244-246  $m\mu$ , sobre a solução a 0,5 mg % em ácido clorídrico 0,1 N, pelos motivos atrás referidos.

No quadro seguinte encontram-se reunidos os valores obtidos de diferentes dosagens pelas várias técnicas.

Aconselhamos a técnica espectrofotométrica para o doseamento do cloridrato de clordiazepóxido nos preparados galénicos, operando do seguinte modo: separar o pó correspondente a 5 ou 10 cápsulas (ou pulverizar as drageias depois de eliminar a camada corada), adicionar CIH 0,1 N e completar o volume de 100 ml; agitar durante alguns minutos, filtrar e diluir 1 ml do filtrado com o mesmo ácido até 100 ml; ler a extinção a 245  $m\mu$ , usando CIH 0,1 N como líquido de comparação.

Calcular a quantidade em mg do cloridrato de clordiazepóxido por cápsula, ou drageia, multiplicando o valor lido por  $\frac{5}{0,49}$  ou  $\frac{10}{0,49}$ , respectivamente (conforme se trate de produto com 5 ou 10 mg).

Esta técnica foi aplicada em cápsulas e comprimidos preparados por nós e também doutros laboratórios, tendo-se obtido resultados compreendidos entre 95 e 104 % do teórico; parece portanto poder usar-se satisfatoriamente na verificação de rotina da produção, permitindo ainda avaliar a pureza da matéria-prima empregada, pela observação da relação das extinções (Quadro II).

QUADRO II

amostra	extinção lida	quantidade de clordiazepóxido em mg
1	0,470	9,6
2	0,465	9,5
3	0,475	9,7
4	0,510	10,4
5	0,475	9,7
6	0,500	10,2
7	0,530	10,8
8	0,470	9,6
9 *	0,490	5,0
10	0,455	9,3

\* cápsulas de 5 mg.

## CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios efectuados levaram às seguintes conclusões:

1. O cloridrato de clordiazepóxido pode identificar-se por meio de algumas reacções de precipitação, nomeadamente a do IK (com observação do aspecto microscópico do precipitado) e a do ácido pícrico (com determinação do ponto de fusão do precipitado).

2. O espectro no U.V. é característico, apresentando um máximo na zona de  $245\text{ m}\mu$  ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}=980$  em ClH 0,1N) e um mínimo a  $217\text{-}219\text{ m}\mu$ .

3. O doseamento do fármaco pode ser feito por diferentes técnicas: anidrovolumetria, gravimetria com sal de Reinecke e espectrofotometria no U.V.

4. Nos preparados galénicos, aconselha-se o ensaio quantitativo por espectrofotometria no U.V., após extracção com ácido clorídrico 0,1 N.

## SUMMARY

The AA have studied the spectrum in U.V., some reactions of identification and methods of assay of chlordiazepoxide hydrochloride; finally referring their application to the control of tablets and capsules.

The principal conclusions are as follows:

1. Microcrystalline reactions with potassium iodide and with picric acid are characteristic.

2. The spectrum in the U.V. of the  $0.5\text{ mg}\%$  solution in hydrochloric acid 0.1N presents a maximum at  $245\text{ m}$  ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}=980$ ) which permits an assay of galenic preparations.

3. The gravimetric method with Reinecke salt and the anidrous-volumetry permit an assay of this psychotherapeutic agent, in order to verify its purit.

## da Ordem dos Farmacêuticos

## BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) Pat U.S.A. 735381 (Maio, 1958).  
 (<sup>2</sup>) Ref. Lab. Juva.  
 (<sup>3</sup>) Medicamentos de Actualidade (1961).  
 (<sup>4</sup>) CAZINELLI, J. L. e SINCHER, J. E.: *J. Pharm. Sci.*, **51**, 336 (1962).  
 (<sup>5</sup>) MARQUES LEAL, A.: *Relatório enviado à Dir. Geral de Saúde — Com. Med. Novos* (Out. 1961).

# REVISÕES DE CONJUNTO

## INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DO «MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS» (\*)

HENRIQUE DOS SANTOS SILVA  
Licenciado em Farmácia

Falar aos colegas da Investigação Laboratorial do Mycobacterium Tuberculosis é abordar um tema de actualidade e de interesse. De actualidade, porque é assunto que está cada vez mais a ser estudado e de interesse, porque, entre nós, a morbidade e a mortalidade apresentam-se elevadas.

Acentuemos que o aparecimento de fármacos antibióticos e químicos, embora de grande valor, infelizmente, não vieram resolver totalmente os casos existentes de tuberculose. Esta doença, principalmente a de localização brônquica, ainda constitui um grave problema que nem sempre os antibióticos resolvem eficazmente.

Hoje, a tuberculose faz parte das doenças de declaração obrigatória em Portugal, bem como, a título especial, os óbitos por esta doença (\*\*).

Existe, graças à Organização Mundial de Saúde, a União Internacional Contra a Tuberculose a qual está encarregada de planear a luta contra a tuberculose espalhada pelo mundo. Esta tem actualmente oito Subcomissões das quais destacamos a quarta sobre Métodos de Laboratórios, sob a direcção do Prof. K. A. JENSEN, da Dinamarca.

Todos os anos a União Internacional Contra a Tuberculose edita um Boletim no qual relata os progressos realizados no domínio da

(\*) Conferência proferida na Soc. Farm. Lusitana (Março de 1962).

(\*\*) Na lista das doenças de notificação obrigatória em Portugal metropolitano destacamos: 28 a) Tuberculose do aparelho respiratório e 28 b) Outras formas de tuberculose, cabendo-lhes na lista internacional de classificação de doenças e causas de morte os números 001-008 e 009-019, respectivamente.

Tuberculose e estabelece as normas para o estudo e combate ao *Mycobacterium tuberculosis* (\*).

Ao falar da investigação laboratorial do *Mycobacterium tuberculosis*, não posso esquecer o sentido prático com que devo apresentar este tema, tanto mais que ele diz respeito aos colegas que, no silêncio dos seus laboratórios de análises clínicas, prestam ao médico e ao doente a sua colaboração.

## I — MEDIDAS DE PROTECÇÃO DO PESSOAL DE LABORÁRIOS DE TUBERCULOSE

Mostra a prática que, por vezes, o pessoal, que trabalha com produtos contaminados ou que lida com doentes, contrai a tuberculose. Deste modo, a União Internacional Contra a Tuberculose recomenda tomar as seguintes precauções:

1.º — O pessoal deve reagir à tuberculina e, se necessário, sofrer a vacinação pelo B. C. G.

2.º — O pessoal deve ser vigiado por um Dispensário Anti-Tuberculoso e submeter-se duas vezes por ano a uma prova da tuberculina e a um exame radiográfico.

3.º — Toda a manipulação de bacilos virulentos deve ser efectuada dentro de uma câmara convenientemente ventilada.

4.º — Após o trabalho, o lugar da manipulação e a câmara devem ser inundados de raios ultra-violetas.

5.º — O pessoal, não treinado, não deve manipular bacilos virulentos. Um período de aprendizagem de seis meses, apòximadamente, precederá o acesso à manipulação.

## II — COLHEITA DE PRODUTOS BIOLÓGICOS

A colheita dos produtos biológicos e o seu tratamento constituem, por vezes, o êxito das operações.

*Expectoração:* É nas expectorações que maior número de vezes pesquisamos o *Mycobacterium tuberculosis*. O processo de colheita assume, neste caso, um papel importante.

A expectoração deve ser colhida em jejum ou, então, tendo a boca limpa, para que a expectoração não venha acompanhada de produtos alimentares. Em regra, é de manhã que as expectorações são mais abundantes.

A expectoração a colher será a pulmonar ou brônquica e não a saliva, como confundem muitas vezes os doentes.

As vezes, bastam os primeiros escarros para que se proceda à análise. Isto é suficiente quando os exames são logo positivos. Quando os

(\*) Para o nosso caso interessa-nos de sobremaneira o n.º 1-2 — Vol. XXIV — Janeiro-Abril de 1954 que estabelece as técnicas padronizadas dos métodos de laboratório e «7.º Rapport sobre Comité d'experts de la tuberculose» (N.º 195) editado pela O. M. S., Génova (1960).

exames são negativos e há suspeita de qualquer infecção deste género, é útil recomendar a repetição, por duas ou três vezes, da pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* ou, então, proceder à colheita da expectoração durante 24 horas.

Acontece algumas vezes que os doentes não têm expectoração e há fortes suspeitas. Neste caso temos de recorrer a artifícios, como os xaropes expectorantes ou aerosol de Tripsina (\*).

A pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* deve incidir sobre as partes purulentas da expectoração. Um exame directo cuidadoso dispensa a homogeneização. A pesquisa deve ser efectuada logo após a emissão da expectoração, preferentemente. Em todo o caso, podem passar-se algumas horas, mas não convém que sejam ultrapassadas as 24-72 horas por causa da acção proliferante das outras bactérias e da acção lítica dos enzimas que destroem o *Mycobacterium tuberculosis*.

*Urina:* A colheita da urina deve ser feita, preferentemente, por algaliação, assumindo maior responsabilidade no caso da mulher. No homem, após uma higiene íntima e rejeição das primeiras gotas de urina, procedemos à colheita para um balão esterilizado.

Outras vezes, temos a necessidade de algaliar um dos rins para sabermos qual deles está atacado, operação esta que deve ser feita por um urologista.

Devemos obter a urina da primeira micção da manhã por ser aquela que se apresenta mais concentrada.

A pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis*, pelo exame directo, faz-se por centrifugação do sedimento urinário durante 15 minutos a 3000 r/m. Estende-se numa lâmina o sedimento centrifugado e cora-se pelo método de ZIEHL-NEELSEN.

Uma urina com bacilos ácido-resistentes vem acompanhada de piocitos, hematúria e proteinúria. Temos de desconfiar quando, na ausência destes elementos, podemos observar bacilos ácido-resistentes. Trata-se em regra de bacilos smegmas (*Mycobacterium smegmatis*) e, portanto, precisando de confirmação.

*Líquido pleurítico e cefalo-raquidiano:* A colheita destes líquidos deve revestir-se de máxima assepsia. Deste modo, acha-se facilitada a técnica, podendo dispensar-se a homogeneização que seria análoga à da expectoração.

A centrifugação deve ser demorada — 30 minutos — e realizar-se logo que o líquido chegue ao laboratório para evitar a formação de fibrina que dificulta a pesquisa.

Afirma-se que num liquor, apresentando já coágulos de fibrina, o *Mycobacterium tuberculosis* encontra-se nele envolvido e, portanto,

(\*) A tripsina é utilizada com sucesso para facilitar a lise das secreções brônquicas e a sua eliminação das vias respiratórias. Deste modo, facilita-se a obtenção da expectoração, o volume é maior, fluidifica-se o conteúdo brônquico provocando a sua eliminação e o produto obtido apresenta-se quase homogeneizado.

Empregamos uma solução de tripsina a 0,250 em 10 ml de solvente tampão neutro (250 000 U.) procedendo-se à nebulização.

Os autores afirmam que esta técnica dá resultados superiores à intubação gástrica (LUCE, J.-P., HUBERT, J. e LUCE, M.: «Recherche du B. K. sur expectoration recueillie après aérosol de trypsin», La Presse Médicale 53:2453:1961).

devemos espalhar cuidadosamente o coágulo de fibrina sobre uma lâmina e procedermos à coloração.

Para o líquido pleurítico podemos recorrer ao emprego de anti-coagulantes para evitarmos a coagulação da fibrina. Serve o citrato de sódio a 5 % na proporção de 1 parte para 18 a 19 partes de líquido.

Na colheita o médico deve desprezar as primeiras gotas para evitar um líquido sanguinolento.

É de boa prática, para uma cultura, deitar umas gotas do sedimento não tratado para um tubo de cultura, a par do sedimento tratado.

**Tecidos-gânglios:** O produto é cuidadosamente macerado e introduzido em balões esterilizados, contendo pérolas de vidro, sendo depois tratado de modo idêntico ao das expectorações.

Para transporte, os fragmentos podem ser introduzidos em frascos contendo uma solução de fosfato trisódico a 10 %.

Para a cultura semeamos uma parte não tratada e outra tratada.

**Suco gástrico:** A colheita do suco gástrico para a pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* tem duas justificações: a primeira, quando se tratam de crianças; a segunda, em adultos que não têm expectoração.

Essa colheita deve ser feita em jejum. Após o doente ter gargarejado com um soluto de novocaína a 2 % para anestesiar ligeiramente a laringe, procede-se à colheita por meio de uma sonda, pela boca ou pelo nariz.

Nem sempre os doentes em jejum apresentam suco gástrico em abundância. Neste caso, fazemos uma lavagem ao estômago com 100 a 200 ml de água destilada tépida. Também poderíamos aproveitar o aumento da secreção gástrica após a injeção de histamina, como fazemos para o traçado da curva de acidez gástrica.

A pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* no suco gástrico tem de ser efectuada o mais rapidamente possível, pois, passado meia hora, o suco gástrico tem uma acção lítica sobre o bacilo. Para evitarmos isto, poderemos neutralizar o suco gástrico pela soda.

A primeira operação a fazer é proceder à centrifugação de todo o suco gástrico. O sedimento é depois homogeneizado.

A presença de bacilos ácido-resistentes no suco gástrico exige aqui uma confirmação cultural, por causa de outros bacilos ácido-resistentes que não são o *Mycobacterium tuberculosis*.

**Exsudato laríngeo:** A colheita é feita por zaragatoa ao nível da laringe, por esfregação das lesões.

**Fezes:** Em regra, a pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* nas fezes não se faz, atendendo que a pesquisa no suco gástrico é de mais fácil execução.

Trituram-se 50 gramas de matérias fecais juntando cloreto de sódio a 5 % até obtermos uma massa semi-líquida. Passam-se sobre gaze estéril e enche-se com o filtrado um tubo de centrifuga até  $\frac{2}{3}$ . Juntam-se 2 ml de uma mistura em partes iguais de éter sulfúrico e ligroína. Agitam-se fortemente os tubos e centrifugam-se a grande velocidade, durante 30 minutos. Debaixo da camada superior do éter encontra-se um anel acastanhado de 1 a 2 mm de espessura que pode conter o *Mycobacterium tuberculosis*.

Para a coprocultura emulsionamos num almofariz cerca de 1 g de matérias fecais em 12 a 15 ml de uma solução de tripaflavina a 1 por mil. Filtramos várias vezes (6 vezes) sobre faze estéril. Adicionamos ao filtrado uma quantidade dupla de ácido sulfúrico a 1 %. Deixamos em contacto uma hora e, depois, neutralizamos pela soda (o que pode ser facultativo). Centrifugamos a 5000 r/m, durante 15 minutos. Decantamos e semeamos em meio de Lowenstein-Jensen. No caso de desejarmos fazer a inoculação, basta diluirmos o sedimento em soro fisiológico.

### III — COLORAÇÃO DO «MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS»

O *Mycobacterium tuberculosis* foi observado, pela primeira vez, em 1882, por KOCH que empregou o azul de metileno alcalino actuando durante 24 horas. Desde esta data até hoje, grande é o caminho percorrido pelos bacteriologistas à procura de uma técnica de coloração segura.

No mesmo ano ERLICH modificou o método de KOCH, empregando o violeta de metilo anilado ou a fucsina como corantes, fazendo-os actuar durante 15 a 30 minutos e descorando com o ácido azótico diluído. Assim, estabeleceu-se o conceito de «ácido-resistência».

Outros investigadores, como NEELSEN, utilizaram o ácido clorídrico e sulfúrico. RINDFLEISCH empregou o álcool juntamente com o ácido nítrico, como descorante, e praticou a fixação dos corantes por calor.

Também na mesma data da descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, ZIEHL preparou um corante que tem o seu nome. Deste modo, chegou-se à clássica técnica de ZIEHL-NEELSEN, ainda muito difundida:

1.º — Cobrimos a lâmina com fucsina de ZIEHL e aquecemos durante 10 minutos até à emissão de vapores, evitando a ebulição.

2.º — Tratamos a lâmina com ácido nítrico a  $\frac{1}{4}$  ou ácido sulfúrico a  $\frac{1}{4}$ , durante 30 segundos.

3.º — Escorremos o ácido, lavamos a lâmina com álcool absoluto e mantemos o contacto com o álcool durante 5 minutos.

4.º — Lavamos a lâmina com água.

5.º — Cobrimos a preparação com azul de metileno, mantendo a acção do corante durante 1 minuto.

6.º — Novamente lavamos a lâmina com água.

7.º — Secamos a lâmina na estufa a 37.º e examinamos ao microscópio.

O *Mycobacterium tuberculosis* aparece como um bacilo corado de vermelho-vivo sob fundo azul.

A União Internacional Contra a Tuberculose indica uma outra técnica que afirma ser mais simples e segura:

1.º — Colocamos sobre a lâmina um rectângulo de papel de filtro com as dimensões da lâmina, e cobrimos com fucsina fenolada de ZIEHL. Aquecemos a lâmina até à emissão de vapores e mantemos este aquecimento durante 2 minutos.

2.º — Lavamos bem com água a lâmina.

3.º — Cobrimos a lâmina com uma solução de ácido sulfúrico a 25 % durante 1 minuto.

4.º — Lavamos a lâmina novamente com água.

5.º — Fazemos actuar sobre a lâmina o álcool de 96º durante 1 minuto.

6.º — Lavamos novamente a lâmina com água.

7.º — Coramos o esfregaço com ácido pícrico (solução aquosa a 1 %) durante 10 segundos.

8.º — Lavamos a lâmina com água e secamos na estufa.

Ao microscópio o *Mycobacterium tuberculosis* aparece como um bacilo vermelho-vivo sob um fundo amarelo.

Também, querendo, podemos empregar como contraste o azul de metileno ou o verde malaquite.

A observação microscópica é feita durante 3 minutos, tempo este que JENSEN acha suficiente para uma pesquisa feita por pessoa experientada.

As causas de erro são, segundo o Boletim da União Internacional Contra a Tuberculose:

1.º — A solução de fucsina fenicada pode estar mal preparada. Nem todas as marcas de fucsina são boas para a preparação do reagente.

2.º — A lavagem da lâmina em água, depois da acção do ácido, poder ser insuficiente. O bacilo fica amarelo, se existir o menor vestígio de ácido.

3.º — A coloração pelo contraste poder ser muito forte, sobretudo, se empregarmos o azul de metileno ou o verde malaquite.

Os Laboratórios DIFCO (\*) mandam empregar a seguinte técnica de coloração, que seguimos, e se mostra rápida e eficaz:

1.º — Cobrimos a lâmina com carbofucsina e aquecemos até ao aparecimento de vapores durante 3 a 5 minutos. Também podemos cobrir a lâmina com um papel de filtro, previamente.

2.º — Lavamos a lâmina com água.

3.º — Descoramos o esfregaço pelo ácido-álcool o que requer 1 minuto.

4.º — Lavamos a lâmina com água.

5.º — Cobrimos a lâmina com azul de metileno durante 5 segundos.

6.º — Secamos a lâmina e observamos ao microscópio.

O quinto tempo pode ser substituído por outros contrastes tais como o verde malaquite, verde brilhante e ácido pícrico a 0,5 — 1 %, consoante a preferência pessoal.

Alguns laboratórios ainda preferem o método das 24 horas, como descreveu STEENKEN, principalmente quando o número de lâminas a observar é grande. As lâminas são cobertas com carbofucsina e colocadas num incubador em meio húmido durante toda a noite (14-20 horas). São depois lavadas, descoradas pelo ácido-álcool durante 1 a 3 minutos e lavadas novamente com água e depois com álcool etílico

(\*) *Mycobacterium Tuberculosis* — Isolation, Identification, Sensitivity Testing. Manual n.º 141 de Nov. 1961. Ed. Lab. Difco.

durante 1 minuto. As lâminas são contrastadas pelo verde brilhante, lavadas com água e secas.

Em qualquer dos métodos a empregar devemos usar lâminas novas e bem limpas em mistura sulfo-crômica.

A presença de bacilos ácido-resistentes não identifica o *Mycobacterium tuberculosis*, porque as colorações não diferenciam os bacilos presentes, o que tem importância para a execução de um «test» de sensibilidade.

A observação de uma lâmina leva-nos, pois, a afirmar se observamos ou não bacilos ácido-resistentes (AAR).

Nos produtos orgânicos existem bacilos ácido-resistentes, que não são o *Mycobacterium tuberculosis*, mas que apresentam uma morfologia análoga. É o caso das urinas (onde vive o smegma), da água, do suco gástrico, etc.

Antigamente, dava-se grande importância, para fins clínicos, à quantidade de bacilos que o exame directo apresentava por campo o que é hoje destituído de fundamento. Das escalas mais conhecidas temos a de GAFFKY, modificada por BROWN (\*):

- I — Apenas 1-4 em toda a lâmina.
- II — Apenas 1 bacilo em média em muitos campos.
- III — Apenas 1 bacilo em média em cada campo.
- IV — Cerca de 2-3 bacilos em média em cada campo.
- V — Cerca de 4-6 bacilos em média em cada campo.
- VI — Cerca de 7-12 bacilos em média em cada campo.
- VII — Cerca de 13-25 bacilos em média em cada campo.
- VIII — Cerca de 50 bacilos em média em cada campo.
- IX — Cerca de 100 bacilos ou mais em média em cada campo.
- X — Incontáveis em cada campo.

Para fins de investigação, a densidade dos bacilos nos esfregaços pode exprimir-se nos seguintes termos:

- 0 — negativo.
- 1 + — pequeno número de bacilos.
- 2 + — alguns bacilos.
- 3 + — muitos bacilos.
- 4 + — muito numerosos bacilos.

O «American Trudeau Society» apresenta-nos a seguinte escala (\*\*):

- Numerosos (3+): 10 bacilos, na maior parte dos campos.
- Pouco numerosos (2+): 10 ou mais bacilos em toda a expectoração.
- Raros (1+): 3 a 9 bacilos observados.
- Se observarmos 1 ou 2 bacilos, indicamos estes números.

(\*) KOLMER e BOERNER — «Approved laboratory technic», 3.<sup>a</sup> Ed., 1941.

(\*\*) WELSCH, M. — «Les analyses bactériologiques et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques». 1956.

#### IV — INVESTIGAÇÃO DO «MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS» POR MICROFLUORESCÊNCIA (\*)

Os bacilos do *Mycobacterium tuberculosis*, corados por corantes, tais como a rodamina e auramina, logo que sejam submetidos à iluminação de uma luz ultra-violeta, tornam-se fluorescentes, o que permite melhor a sua observação.

Este método, que exige corantes e material especial para se adaptar ao microscópio, não é mais seguro que o método de coloração de ZIEHL-NEELSEN. Com efeito, do mesmo modo que todos os bacilos ácido-resistentes não são o *Mycobacterium tuberculosis*, pelo mesmo motivo todos os corpos fluorescentes de uma preparação, tratado pela auramina, não são bacilos tuberculosos. Outro inconveniente é que nem todos os corpos, que se apresentam fluorescentes, são também bacilos. A sua pesquisa somente tem a vantagem de ser feita com facilidade, devido aos fenómenos luminiscentes.

#### V — HOMOGENEIZAÇÃO

Por critério antigo, um exame directo de uma expectoração negativa obrigava à execução de uma concentração de bacilos por homogeneização.

Hoje, está provado estatisticamente que um exame directo bem feito, tendo o analista o cuidado de fazer o esfregaço com a parte purulenta da expectoração, é o suficiente.

Claro que a homogeneização tem por finalidade destruir a flora habitual, que não interessa, e, por centrifugação, congrega os bacilos. Isto tem importância para a execução da cultura.

Toda a técnica de homogeneização mata um certo número de bacilos. Podemos recorrer a dois tipos de homogeneização: ácida e alcalina. O estudo crítico referente aos dois métodos afirma-nos:

1.º — A homogeneização ácida é mais nefasta para o bacilo tuberculoso que a homogeneização alcalina.

2.º — A homogeneização ácida é mais rápida e mais fácil e, por conseguinte, melhor adaptada à prática corrente.

3.º — A homogeneização ácida apresenta um inconveniente capital: não mata os saprófitas ácido-resistentes. Num exame do suco gástrico ou de uma urina, não obtida por algaliação, esta técnica está sujeita a dificuldades diagnósticas consideráveis, que só um bacteriologista experimentado pode resolver sem recorrer a numerosas inoculações ao cobaio.

A homogeneização pela soda (PETROFF) oferece a grande vantagem de serem mortos praticamente todos os saprófitas ácido-resistentes.

(\*) NÉVOT, A. — «Le diagnostic bactériologique en pratique médicale». 1958.

O problema é então de saber se esta vantagem substitui o inconveniente, que esta técnica apresenta, em dar um rendimento em bacilos tuberculosos maior do que em relação à técnica ácida.

Para a cultura do bacilo, a título puramente de diagnóstico, a homogeneização ácida pode ser recomendada, porque se trata de escolher a prova mais sensível.

Para a medida da resistência, pelo contrário, logo que o diagnóstico bacteriológico seja posto, é muito importante excluir a possibilidade dos saprófitas e recomenda-se a técnica pela soda.

Para fins de concentração, podemos recorrer à homogeneização que, como sabemos, pode ser ácida ou alcalina.

Para executarmos a *homogeneização ácida*, tomamos 0,5 a 1 ml dos fragmentos mais suspeitos e colocamos num tubo de centrifuga de 100×16 mm. Adicionamos 2 ml de ácido sulfúrico a 6 volumes por cento. Tapamos com uma rolha de borracha que se ajuste perfeitamente. Agitamos vigorosamente até que o conteúdo se torne completamente fluido, o que se consegue num agitador do tipo KHAN, e abandonamos 10 minutos à temperatura do laboratório. Enchemos o tubo com água destilada estéril, tapamos o tubo e centrifugamos a grande velocidade durante 10 minutos. Deitamos o sedimento por meio de ansa ou duma pipeta Pasteur para dentro do meio de cultura. Não é necessário lavar ou neutralizar, se empregarmos o meio de LOWENSTEIN-JENSEN com 0,75 % de glicerina ou qualquer outro meio, desde que o pH seja 7,2 a 7,4.

Para executarmos a *homogeneização alcalina* tomamos 0,5 a 1 ml de expectoração para dentro de um tubo de centrifuga análogo ao método antecedente e juntamos mais ou menos igual quantidade de soda a 4 %. O tubo é agitado vigorosamente até que o conteúdo se torne fluido, depois é mantido a 37°, durante 20 minutos, a grande velocidade. O sedimento é neutralizado com III gotas de ácido clorídrico a 8 % (ou, então, na presença de um indicador, que é o tornezol) e distribuído por tubos de cultura com uma pipeta Pasteur.

Uma modificação desta técnica e seguida num laboratório idóneo é a seguinte: um certo volume de expectoração é tratada com igual volume de soda a 4 % ou um pouco mais, consoante as necessidades. Agitamos o conteúdo e colocamos na estufa durante 20 minutos, agitando duas vezes durante este tempo. Juntamos um pouco de água destilada esterilizada e centrifugamos durante 20 minutos a 3000 r/m. Decantamos o tubo de centrifugação e o sedimento é adicionado de III gotas de ácido clorídrico a 8 %. Agitamos e deixamos em repouso 10 minutos. Ao fim deste tempo, juntamos VI gotas de penicilina a 200 unidades por ml. Abandonamos o sedimento por mais 10 minutos, findos os quais colocamos V gotas em cada tubo de cultura, de modo a banhar toda a superfície do meio. Os tubos são tapados com rolhas de algodão cardado esterilizado e queimado até à entrada dos tubos. Colocamos um papel de parafilme e fazemos um pequeno orifício para entrada livre do ar.

Podemos aproveitar a ocasião para fazer um esfregaço e corar pelo ZIEHL-NEELSEN. Em expectorações positivas a homogeneização dá em regra 4 a 5 vezes mais bacilos que no exame directo.

## VI — MEIOS DE CULTURA

Não vamos aqui descrever todos os meios de cultura para o *Mycobacterium tuberculosis*. Isto sozinho constituiria assunto para muitas páginas. Um estudo comparativo e imparcial destes meios foi publicado pela revista «American Revue Tuberculosis» (\*). Quem não possua esta revista poderá consultar o Boletim da União Internacional Contra a Tuberculosis e os Manuais DIFCO (\*\*) e OXOID (\*\*\*). Sobre este assunto diz o Boletim da União Internacional Contra a Tuberculose, muito judiciosamente: «Parece aconselhável reduzir o número de meios de cultura tanto quanto a prudência permitir».

Os meios de cultura para o *Mycobacterium tuberculosis* podem ser sólidos ou líquidos. Um meio sólido é necessário para o isolamento do bacilo. Os meios líquidos têm por finalidade obtermos culturas necessárias a certas provas, particularmente, à inoculação de animais ou à preparação de antigénios.

*Meios sólidos:* Um meio sólido deve responder às seguintes exigências:

1.º — Deve assegurar as condições óptimas de crescimento aos três tipos de bacilos tuberculosos, e constituir um mau terreno para as bactérias coexistentes.

2.º — Deve ser fácil de preparar, mesmo para pequenos laboratórios.

Quanto a esta última questão, hoje, alguns laboratórios apresentam o meio de fácil preparação como, por exemplo, os Laboratórios DIFCO e OXOID. Dado que os preços destes meios não são exagerados, manda a prática que eles sejam comprados já preparados o que assegura o emprego de um meio convenientemente preparado e sem perda de tempo. Além disso, estes meios preparados duram no frigorífico 6 meses.

Nos meios sólidos importam as substâncias que entram na sua composição. Assim, o emprego de glicerina tem a propriedade de atrasar o crescimento do bacilo tipo humano e impedir o bacilo do tipo bovino. Investigações sistemáticas revelam que a concentração óptima de glicerina no meio de ovo é de 0,75 % tanto para o tipo humano como para o bovino. Entretanto, o bacilo do tipo bovino, proveniente do gado, cultiva melhor sem glicerina. Para o isolamento do bacilo, tipo aviário, é preferível a concentração de 4 %.

O Boletim da União Internacional Contra a Tuberculose diz: «Um meio à base de ovo, contendo 0,75 % de glicerina, assegura todas as condições de crescimento óptimas tanto para o bacilo humano como para o bacilo bovino, desde que provenha do homem. É então de recomendar. Por outro lado, este meio permite o diagnóstico por cultura para o tipo humano e para o tipo bovino. O aspecto das culturas dos bacilos saprófitas difere suficientemente das outras culturas de bacilos

(\*) Am. Rev. Tub. 1951, t. 63, pág. 459 e 470.

(\*\*) Difco — Ob. cit.

(\*\*\*) The Oxoid Manual. London. 1961.

tuberculosos os quais só uma pessoa experimentada pode distinguir e evitar assim numerosas inoculações ao cobaio».

A este tipo de meio pertence o meio de LOWENSTEIN, modificado e glicerinado a 0,75 % (na maioria das vezes chamado LOWENSTEIN-JENSEN). Existem outros meios, como o de Petraghani e o do «American Trudeau Society», mas estes são glicerinados somente a 1 %.

Outras substâncias estimulantes são a asparagina e diversos sais. A sua importância é menor, comparada com a da glicerina para os meios à base de ovo. A adição de fécula de batata serve só para evitar a dessecação do meio. Há poucas probabilidades de modificar os meios, modificando as proporções das substâncias estimulantes que acabámos de citar.

O meio de LOWENSTEIN-JENSEN apresenta-se corado devido a uma substância inibidora de certos microrganismos que é o verde malaquite. Actualmente, é o corante mais empregado para inibir as bactérias. As colónias amareladas dos bacilos do tipo humano distinguem-se facilmente sobre o fundo verde do meio. As colónias transparentes dos bacilos bovinos fazem virar o meio para amarelo que as torna mais visíveis. Por outro lado, os bacilos tuberculosos cultivam melhor em presença do verde malaquite do que na sua ausência.

Têm-se empregado, como substâncias inibidoras do crescimento de outras bactérias, certos antibióticos. O primeiro a ser utilizado foi a Penicilina. Hoje sabe-se que o critério mais justificado seria fazer um teste de sensibilidade aos antibióticos para as bactérias acompanhantes e empregar o antibiótico que se mostra sensível. Ora isto tem um inconveniente que é a introdução de um factor estranho que pode inibir o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, como acontece com a Kanamicina. Contudo, só a Penicilina é que tem sido utilizada sem que prejudique o crescimento da micobactéria em estudo.

A preparação do meio é um pouco dificultosa e morosa. Para um laboratório de pequeno movimento um problema que se põe é da economia de tempo e custo. Embora seja preferível comprar os meios já feitos, os laboratórios DIFCO Oxoid fornecem o meio desidratado de fácil preparação.

As condições mais favoráveis à cultura são:

- 1.º — Impedir a evaporação, de modo que o meio possa ser conservado dois meses a 38°, sem secar.
- 2.º — Evitar o aumento da quantidade de água de condensação.
- 3.º — Procurar que o ar atmosférico entre livremente para que o *Mycobacterium tuberculosis* tenha oxigénio à sua disposição durante todo o período de crescimento.
- 4.º — O vidro ser de boa qualidade, não ceder alcali ou substâncias inibidoras. Os vidros Pirex ou de Jena são os melhores.
- 5.º — A temperatura da estufa ser mantida a 37-38°, de maneira constante.

As culturas positivas são então classificadas de acordo com a seguinte escala:

- 0 — Tubos negativos depois de 3 meses de incubação.
- I — 1 a 4 colónias (média dos três tubos).

- II — 5 a 10 colónias (média dos três tubos).
- III — 15 a 20 colónias (média dos três tubos).
- IV — 21 a 50 colónias (média dos três tubos).
- V — 50 a 60 colónias (média dos três tubos).
- VI — Mais de 60 colónias isoladas.
- VII — Mais de 60 colónias confluentes.

Os tubos de cultura são colocados em posição horizontal.

Os autores verificaram que quase todas as expectorações positivas dão bacilos viáveis em cultura, facto importante de considerar (\*). Em regra, ao fim de 15 dias, os bacilos tornam-se visíveis. Nas expectorações negativas ao exame cultural, ao fim destes dias, nunca o devemos dar por terminado, devendo continuar-se a incubação até 3 meses.

*Meios líquidos:* Os meios líquidos convêm a sub-culturas duma estirpe a partir de uma colónia isolada em meio sólido, ao estudo das medidas de virulência e à medição da resistência aos antibióticos.

Destes meios destacamos o de DUBOS, BESREDKA com verde malaquite, meios sintéticos com fracção V de albumina, etc.

## VII — DETERMINAÇÃO DOS TIPOS DE BACILOS TUBERCULOSOS

A diferenciação dos vários tipos de *Mycobacterium tuberculosis* (humano, bovino e aviário) é de interesse analítico e, por vezes, nem sempre fácil. Facilita-se a diferenciação pelo emprego do mesmo meio de cultura de que salientamos o de LOWENSTEIN-JENSEN com 0,75 % de glicerina permitindo a um experimentado fazer tal distinção.

Assim, para o citado meio, os dados de diferenciação dos tipos de bacilos tuberculosos são:

*Estirpes humanas típicas:* As colónias são grosseiras ou finamente plissadas, rugosas (Rough) de consistência cerosa. A princípio elas são ligeiramente amareladas, mais tarde tornam-se mais pigmentadas. São dificilmente emulsionáveis.

*Estirpes bovinas típicas:* As colónias são pequenas, lisas (Smooth), planas, transparentes e de consistência cremosa. Não são pigmentadas, mas como fazem virar o meio verde para amarelo, parecem amarelas à temperatura do laboratório. O meio torna-se verde e as colónias distinguem-se facilmente. São muito emulsionáveis.

*Estirpes aviárias:* As colónias são igualmente lisas e transparentes, mas elas são maiores, mais curvas, aparecem e crescem mais rapidamente do que as colónias das estirpes bovinas.

As estirpes aviárias só muito raramente aparecem nas culturas e são desprovidas de significado.

(\*) DAVID e cols. (1960) verificou experimentalmente que a frequência do fracasso da cultura é de cerca de 9 %.

Este mesmo autor chama a nossa atenção para a labilidade particular do bacilo tuberculoso tipo africano e indiano que apresenta uma taxa elevada de fracassos culturais.

A tuberculose humana, de origem bovina, aparece mais na criança enquanto que o adulto é mais raramente afectado. A contaminação é sobretudo de origem digestiva (absorção pelo leite cru).

As colónias de bacilo bovino, em virtude da lentidão do seu desenvolvimento sobre o meio de LOWENSTEIN-JENSEN glicerinado (30 a 70 dias), são qualificadas de *disgónicas* em oposição às colónias eugónicas do bacilo humano (12-20 dias). As colónias R e S são formadas por bacilos da mesma virulência. As colónias R podem transformar-se em colónias S e vice-versa (*dissociação*).

Existe um certo número de micobactérias denominadas «atípicas, cromogéneas, anormais, anónimas, inclassificadas, paratuberculosas, etc.». Sobre o comportamento destas micobactérias os investigadores estão em desacordo e mantém-se hoje acesa discussão sobre o assunto. Deste modo os nossos conhecimentos sobre estas micobactérias mantêm-se duvidosas. Vejamos os argumentos dos autores.

HAUDOROY em artigo publicado (\*) resume do seguinte modo as suas opiniões: ao lado do *Mycobacterium tuberculosis* de germes próximos perfeitamente definidos e conhecidos, existem numerosos bacilos paratuberculosos. A sua descoberta não é de data recente, mas sabe-se que a sua cultura faz-se em meios vulgares a 37° apresentando-se pigmentados e sem poder patogénico para o cobaio.

Estes bacilos encontram-se em abundância na natureza em indivíduos sãos, nas secreções nasais, na saliva, cerumen, smegma, suco gástrico, etc.

Nunca as micobactérias paratuberculosas provocaram no homem manifestações apreciáveis, salvo raras excepções. São estes casos excepcionais que vem complicar o problema. Trata-se de verdadeiros bacilos tuberculosos ou são realmente paratuberculosos? A sua identificação torna-se difícil mesmo após colorações, sementeiras, inoculações repetidas (agravadas pelos bacilos isoniazido-resistentes). Perante estes casos raros na prática o problema permanece ainda por resolver.

Como distinguir então um bacilo paratuberculoso do verdadeiro? Sòmente em ensaios repetidos e verificação das propriedades biológicas, com certa persistência. Só assim é que se poderá pensar que tal bacilo é o agente da doença.

É bem certo que a administração de farmacos antibióticos antibacilares provocam modificações no metabolismo dos bacilos tuberculosos transformando-os em micobactérias anormais. Mas, na prática é difícil demonstrar tal fenómeno. É característico o caso dos bacilos isoniazido-resistentes que não se mostram patogénicos para o cobaio, mas que passando para outro indivíduo apresenta a mesma patogenicidade inicial. Demonstrar o mesmo com as micobactérias atípicas é difícil e deste modo o problema apresenta-se irresolúvel.

Para o analista prático o problema reveste-se de acuidade para traduzir uma certeza no resultado que dá.

(\*) HAUDOROY, P.: Baciles tuberculeux, paratuberculeux et micobacteries anormales. La Presse Médicale, 43:1838:1961.

XALABARDER num extenso artigo (\*) passa em revisão o significado das micobactérias inclassificadas, afirmando que as micobactérias constituem um só grupo de micróbios, com um grau de alteração progressiva que se traduz pela perda de muitas propriedades biológicas, alteração esta que é reversível, e portanto, uma estirpe saprófita pode, em certas condições, tornar-se virulenta e vice-versa. Verificou-o «in vitro» e não há motivo para duvidar que também pode ter lugar o mesmo fenómeno «in vivo».

O conceito de unidade filogenética, continua o mesmo autor, de todas as micobactérias foi defendido por grande número de investigadores há muitos anos e está plenamente demonstrado por recentes investigações. Por isso, nada nos surpreende que as tais micobactérias atípicas possam vir de estirpes patogénicas, quer espontaneamente ou sob a acção de farmacos antimicrobianos. Dizer o contrário é basearmos em conhecimentos teóricos sem bases convincentes.

Não há pois justificação, diz-nos XALABARDER, para tentar fazer das micobactérias inclassificadas um grupo à parte, com características próprias e diferentes das micobactérias patogénicas. A sua única diferença consiste em que os farmacos actuais são ineficazes contra as micobactérias atípicas.

Em resumo, para aquele autor as micobactérias atípicas não passam de bacilos atenuados e resistentes como sempre houve, embora actualmente sejam mais frequentes pela acção dos fármacos antimicrobianos além daqueles que se vão adaptando progressivamente. Sem dúvida a doença que provocam não se distingue em nada da tuberculose e deve ser tratada de igual modo.

## VII — DIFERENCIAÇÃO ENTRE BACILOS TUBERCULOSOS E OUTROS SÁPRÓFITAS ÁCIDO-RESISTENTES

Numerosos saprófitas ácido-resistentes cultivam a 38°. É, portanto, muito importante poder verificar rapidamente, e com segurança, se uma cultura positiva é dum saprófita ou dum bacilo tuberculoso.

Não nos podemos basear só num exame microscópico. O crescimento rápido e o aspecto das colónias nem sempre são índice seguro, porque alguns saprófitas desenvolvem-se mais lentamente, como acontece com certos bacilos do tipo bovino ou mesmo bovino. Nestes casos, o diagnóstico exige uma considerável experiência.

Em regra, pelo facto de se trabalhar, durante anos, com o mesmo meio de cultura, o analista adquiriu a experiência suficiente para fazer o diagnóstico sobre o aspecto das colónias e sobre alguns outros caracteres culturais, sem ter de recorrer à inoculação ao cobaio.

Em caso de dúvida, o processo mais rigoroso consiste em recorrer à inoculação, seguindo-se a seguinte técnica:

Preparam-se suspensões contendo 0,1 mg (peso húmido) de bacilos por ml. Injecta-se por cada estirpe 0,1 ml (isto é 0,01 mg de bacilos), por via intradérmica.

(\*) XALABARDER, C.: Las micobactérias «inclassificadas». Laboratório 195:253:1962.

Se um bacilo tuberculoso foi inoculado, um nódulo aparece em poucos dias, amolece e ulcera-se. Passados 10 a 14 dias, os gânglios regionais (inguinais ou axilares) estão nitidamente atrofiados. Estes sinais permitem afirmar o bacilo tuberculoso.

Se foi inoculado um saprófita, a maior parte das vezes não se observa nenhuma reacção local ou, no máximo, uma pequena escarificação que desaparece rapidamente. Raros saprófitas disgónicos pigmentados podem provocar uma reacção local um pouco pronunciada, mas isto desaparece rapidamente sem ulceração nem adenopatia. Podemos sacrificar o cobaio três semanas depois da inoculação e verificamos, então, a realidade da hipertrofia dos gânglios que se pode verificar por apalpação.

Durante este breve período de observação, a tuberculose propaga-se aos gânglios, de maneira que a inoculação simultânea no mesmo animal do bacilo tuberculoso e saprófita não perturba os resultados, salvo se for mal escolhido o local da inoculação.

Após o emprego da isoniazida, uma nova dificuldade aparece. É que as estirpes resistentes àquele fármaco têm uma virulência tão fraca que a sua inoculação provoca somente um pequeno nódulo, sem abcesso nem ulceração e a hipertrofia ganglionar pode ser tardia e muito ligeira.

Para se obter uma tuberculose generalizada é, por vezes, necessário, (mas nem sempre suficiente) inocular menos de 1 mg de bacilos resistentes à isoniazida. Se então descobrirmos, num líquido de lavagem gástrica ou numa urina colhida sem sonda, um bacilo isoniazido-resistente do qual se ignora se é bacilo tuberculoso ou saprófita, é necessário então inocular 1 mg de bacilos ao cobaio. Se provoca uma tuberculose generalizada, o bacilo é seguramente um bacilo tuberculoso. Se não, a questão permanece aberta. O estudo da virulência das camadas resistentes à isoniazida não está ainda bastante avançado para que se possa propor uma prova de diagnóstico válida.

## Centro de Documentação Farmacêutica

### IX — INOCULAÇÕES

Antigamente, afirmava-se que o exame confirmativo de uma análise ao exame directo só poderia fazer-se por inoculação ao cobaio, animal electivo. Hoje, sabe-se que as culturas respondem mais cedo e com mais rigor. O *Mycobacterium tuberculosis* tem perdido muito da sua sensibilidade para o cobaio.

As condições que fizemos quando das colheitas dos produtos e suas homogeneizações, têm aqui cabimento. As inoculações devem ser feitas com o produto tratado e não tratado, consoante a sua natureza.

A injeção será subcutânea na região inguinal, e o animal sacrificado seis semanas depois ou mais tarde ainda. Deve pôr-se em evidência o *Mycobacterium tuberculosis* no abcesso local ou gânglio regional para eliminar a possibilidade duma tuberculose espontânea. Esta manifesta-se na maior parte das vezes por um complexo primário típico gânglio-pulmonar com a comparticipação do fígado.

Devemos inocular sempre dois cobaios, principalmente machos, mantendo-os separados. Inicialmente é necessário verificar se o cobaio não está infectado, pelo que devemos fazer uma reacção à tuberculina, empregando 0,1 ml de tuberculina antiga a 5%. Como as fêmeas durante a gravidez perdem a sensibilidade à tuberculina, assim como a idade do animal também faz diminuir essa sensibilidade, devemos empregar cobaios machos e jovens.

É de todos conhecida, já desde de KOCH, a facilidade que o cobaio tem para a infecção expontânea pelo *Mycobacterium tuberculosis*, razão pela qual é conveniente, após a inoculação, mantermos o animal inoculado em jaula fora de todo o contacto suspeito, assim como verificar se o seu tratador não é portador do mesmo bacilo.

Antes de o sacrificarmos, podemos fazer um «test» à tuberculina. Só em caso positivo devemos abrir o cobaio. O segundo cobaio será sacrificado 2 meses e meio depois da inoculação, se o primeiro for indeme às 6 semanas.

### X — VIRULÊNCIA

Para se conhecer a virulência duma dada estirpe, determinamos a quantidade mínima necessária para se obter no cobaio em 2 meses uma tuberculose generalizada.

A técnica consiste em inocular no cobaio, por via sub-cutânea ou intra-peritoneal, 1 mg,  $10^{-2}$  mg,  $10^{-4}$  mg,  $10^{-6}$  mg etc. de bacilos. Ao fim de 2 meses, fazemos a autópsia marcando em algarismos romanos os graus de virulência:

- I — Abscesso local.
- II — I + hipertrofia dos gânglios regionais e portais.
- III — II + alguns nódulos do fígado.
- IV — Tuberculose generalizada de gravidade média.
- V — Tuberculose generalizada grave.

Podemos recorrer ao coelho porque o bacilo bovino é mais virulento para este animal do que o humano. Neste caso a classificação seria:

- I — Raros nódulos regressivos nos pulmões, por vezes raros nódulos nos rins.
- II — Nódulos regressivos, um pouco maiores, nos pulmões e raros nódulos nos rins.
- III — Tuberculose pulmonar importante e alguns nódulos nos rins ou tuberculose pulmonar pouco acentuada, mas com nódulos no fígado.
- IV — Tuberculose generalizada de gravidade média nos pulmões rins, e fígado.
- IV — Pneumonia, tuberculose mortal ou tuberculose generalizada grave.

O peso, em mg, é medido sobre culturas húmidas, secas, entre várias folhas de papel de filtro. Os cobaios que não morrem expontaneamente são sacrificados dois meses após a inoculação.

## XI — TESTS CITOQUÍMICOS

Diferentes reacções cito-químicas foram propostas para distinguir as micobactérias virulentas das micobactérias avirulentas. Vamos citar somente as principais reacções, embora se conheçam muitas outras.

*Factor Corda*: O aparecimento em serpentina depende da presença de um componente tóxico da superfície bacilar, chamado *factor corda* (cord factor) de BLOCH.

A técnica, para pôr em evidência o factor corda, consiste em tomar culturas com 10 dias, em meio líquido de Tween-albumina, de DUBOS-DAVIS a 0,02 % de Tween 80 e fazer esfregaços que se coram pelo método de Ziehl-Neelsen.

A interpretação do resultado faz-se da seguinte maneira:

Positivo (+): Quando a formação de cordas é tão nítida que não se podem distinguir bem os bacilos.

Duvidoso ( $\pm$ ): Quando há formação de cordas, mas com bacilos que se distinguem claramente.

Negativo (—): Quando o crescimento é completamente desordenado.

*Vermelho Neutro*: As estirpes virulentas do *Mycobacterium tuberculosis* mostram fixar o vermelho neutro em solução tampão alcalino, enquanto as estirpes não virulentas deixam de actuar de maneira semelhante (DUBOS e MIDDLEBROOK). Este «test» cito-químico foi estudado depois por RICHMOND e CUMMINGS e ainda por MORSE, DAIL e OLIZTK, verificando-se que os microorganismos ácido-resistentes não patogénicos eram negativos e incapazes de produzirem lesões no cobaio, enquanto que as culturas positivas ao vermelho neutro produziam lesões. HUGHES, MOSS e HENSON experimentaram depois o «test» do vermelho neutro e chegaram a completo acordo entre os resultados da inoculação aos cobaios e o «test» cito-químico do vermelho neutro em 189 estirpes do *Mycobacterium tuberculosis*, proveniente de origem humana. Estes autores provaram que este «test» cito-químico era de confiança e satisfatório com decidida economia de tempo para um diagnóstico final.

A técnica para sua demonstração consiste em tomar uma ansa bem cheia de uma cultura proveniente de um meio sólido e lavar duas vezes com metanol a 50 % e uma vez com soro fisiológico. Depois da última centrifugação, os bacilos são suspensos em 5 ml de tampão veronal de pH 8,9 (Cloreto de sódio 5 g, Veronal sódio 1 g, Água destilada, q. b. p. 100 ml) ao qual juntamos III gotas duma solução aquosa milesimal de vermelho neutro. A leitura é feita depois de uma hora, à temperatura ambiente.

A interpretação do resultado é feita do seguinte modo:

Positivo (+): Quando os bacilos tomam a cor vermelha e os seus grumos aparecem como pontos vermelhos em suspensão.

Intermediário ( $\pm$ ): Quando os grumos tomam um cor rosa desva-nescente.

**Negativo** (—): Quando o líquido conserva a cor amarela e os grumos dos bacilos não se coram.

Os Laboratórios DIFCO aconselham que, após cada tratamento pelo metanol, se incube durante 1 hora a 37°, agitando de 15 em 15 minutos.

A reacção do vermelho neutro é muito útil para o diagnóstico. Permite, por exemplo, distinguir «in vitro» as estirpes humanas virulentas das outras isoniiazido-resistentes e o poder patogénico atenuado das estirpes atípicas.

**Catalase:** As micobactérias possuem enzimas chamadas catalases que decompõem o peróxido de hidrogénio, assegurando, assim, a sobrevivência do germe microbiano. As micobactérias patogénicas, normalmente constituídas, e as micobactérias atípicas são possuidoras de catalases. As estirpes de bacilos, primitivamente virulentas e tornadas resistentes à hidrazida, perdem, na maior parte das vezes, ao mesmo tempo que a sua actividade patogénica para o animal, a sua actividade catalásica. Esta actividade catalásica é de fácil investigação.

As colónias sobre o meio de LOWENSTEIN-JENSEN glicerinado com um ou dois meses são cobertas de uma mistura em partes iguais duma solução aquosa de Tween 80, a 10 %, e de peróxido de hidrogénio, a 30 %.

A interpretação do resultado faz-se assim:

**Positivo (+):** Se as bolhas aparecem durante os trinta primeiros segundos.

**Duvidoso (±):** Se as bolhas aparecem mais tarde, durante os dez primeiros minutos.

**Negativo (—):** Se não há libertação de gás.

Este «test» cito-químico também pode ser feito passando as colónias para um tubo de hemólise e efectuando então a reacção acabada de indicar.

**Diclorofenolindofenol:** WILSON, KALISH e FISH verificaram que as camadas avirulentas e saprófitas possuem uma certa desidrogenase que reduz (descora) os corantes utilizados neste «test».

Uma ansa de cultura, proveniente de um meio sólido, é emulsionada numa solução que se prepara dissolvendo dois comprimidos (4 mg) de diclorofenolindofenol Roche em 100 ml de tampão de fosfatos, dos pH 7,0. A leitura faz-se após 10 a 15 minutos, a temperatura ambiente, da seguinte maneira:

**Positivo (+):** A solução permanece incolor.

**Intermediário (±):** A solução toma uma cor azul muito clara.

**Negativo (—):** A solução permanece azul vivo.

**Auramina:** ERLICH descreveu um método para detectar e diferenciar as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* em culturas mistas, usando o corante de auramina. Estirpes tuberculosas são colocadas em meio de ácido-oleico-albumina-agar (Bacto-Middlebrook 7H9 ou 7H10 Agar DIFCO, enriquecida com Middlebrook OADC Enrichment DIFCO). As placas inoculadas são incubadas a 35-38°, durante 2 a 3 semanas, e examinadas as colónias de bacilos tuberculosos. As placas são então borrifadas com 2 a 3 ml de um soluto alcoólico alcalino de auramina e agitadas circularmente para o corante contactar com todas

as colónias. Dentro de 1 minuto as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* coram de amarelo-vivo sobre um fundo quase sem cor. As outras colónias permanecem sem cor.

A solução alcoólica de auramina é preparada um pouco antes do seu emprego pela adição de igual volume de um soluto a 0,1 % de auramina, em álcool etílico de 95 % com um soluto de hidróxido de sódio normal.

*Discos de auramina:* Os discos de diferenciação de auramina são recomendados quando se deseja rapidamente diferenciar o *Mycobacterium tuberculosis* das micobactérias não patogénicas. ERLICH observou que, quando o *Mycobacterium tuberculosis* é posto em contacto com um disco impregnado de auramina, a cor amarelo-vivo do corante persiste durante mais de dois minutos depois da adição de OHNa 0,5 N. Os discos de auramina, contendo as micobactérias não patogénicas, são completamente descoradas depois de expostas ao hidróxido de sódio.

Os organismos ácido-resistentes, mais vulgarmente agrupados como Fotocromogénias (\*), Escotocromogénias (\*\*) e Não-Fotocromogénias, dão «tests» positivos. Contudo, a cor produzida varia de amarelo a vermelho-vivo com aqueles microorganismos ácido-resistentes. Organismos não ácido-resistentes, geralmente encontrados nas culturas do *Mycobacterium tuberculosis*, são auramino-negativas.

Para diferenciar o *Mycobacterium tuberculosis* das micobactérias não-patogénicas, procede-se como se segue:

1.º — Colocamos 2 Bacto-Differentiation Disks, Auramine (DIFCO), e um disco em branco não tratado dentro de um caixa de Petri, separados 1 cm.

2.º — Usando um aplicador estéril de madeira, colocamos sobre o disco de Auramina uma pequena quantidade de cultura a ser examinada.

3.º — Repetimos a condição anterior com o disco em branco sem auramina, usando um aplicador limpo.

4.º — Deitamos duas gotas de soluto de hidróxido de sódio 0,5 N (2 g de soda dissolvidas em 100 ml de água) em cada um dos três discos.

5.º — Após 2 minutos, observamos a presença da cor amarela sobre um fundo descorado do disco.

*Test da Niacina:* Para a execução deste «test», os Laboratórios DIFCO mandam empregar o Bacto-TB Niacin Test Base adicionado do Bacto-Dubos Albumin Medium, fazendo a diferenciação do *Mycobacterium tuberculosis* humano das outras micobactérias.

KONNO demonstrou uma diferença qualitativa acentuada na síntese da niacina pelo bacilo tuberculoso humano das outras micobactérias quando crescem num meio sintético. Aproveitando este fenómeno,

(\*) Fotocromogénias: Micobactérias que em colónias permanecem não pigmentadas durante o seu desenvolvimento na obscuridade da estufa e só à luz do laboratório é que elas adquirem a sua coloração.

(\*\*) Escotocromogénias: Micobactérias cuja pigmentação se estabelece na obscuridade da estufa e as colónias têm praticamente, logo após o seu aparecimento, a sua pigmentação.

KONNO estabeleceu um método químico para diferenciar o bacilo tuberculoso do tipo humano de outros tipos de micobactérias. Ensaiou a anilina e o método do brometo de cianogénio de FERNSTEIN para medir a produção de niacina das culturas das micobactérias. O bacilo tuberculoso do tipo humano produz uma intensa cor amarelo-canário por este método, enquanto que o bovino, o aviário, não patogénicos e as micobactérias atípicas não a produzem. KONNO e SBARRA idealizaram o processo do «test» da niacina, usando um meio líquido de Tween-Albumina. Outras modificações do «test» foram feitas por RUNYON e TARSIHIS que empregaram a fórmula e a técnica que vamos descrever:

1.º — Inoculamos o meio com culturas concentradas do organismo «test»

2.º — Incubamos os tubos inoculados em posição horizontal, a 37°, durante 7 a 21 dias, de modo a obter um crescimento luxuriante.

3.º — Juntamos II gotas de água destilada estéril, o que depende da quantidade de água existente, e colocamos os tubos em posição horizontal com o líquido cobrindo as colónias durante 5 minutos para extrair a niacina.

4.º — Retiramos IV gotas do extracto para um tubo de hemólise de 10×100 mm.

5.º — Esterilizamos o extracto durante 15 minutos a 121°.

6.º — Por cada IV gotas do extracto estéril juntamos II gotas de anilina a 4 % em álcool de 95 % e 10 % de brometo de cianogénio, dissolvido em água destilada, e agitamos para misturar cuidadosamente.

7.º — Esperamos 5 minutos e observamos o desenvolvimento da cor amarela.

8.º — Devemos usar um tubo não inoculado como testemunha.

9.º — Sòmente o bacilo tuberculoso humano dará o «test» positivo.

## XII — TESTS SEROLÓGICOS

PARLETT e YOUMANS demonstraram que os anticorpos micobacterianos podem ser detectados por difusão num tubo de agar, segundo modificação da técnica de OUDIN e OUCHTERLONY. O processo consiste em juntar a duas partes do antigénio micobacteriano uma parte do soluto de Agar, purificado a 50°. Os Laboratórios DIFCO preparam os reagentes para esta reacção como o Bacto-H37 Ra Antigen, o Bacto-H37 Ra Antiserum e Agar Double Diffusion Test for Mycobacterial Antibodies.

Depois de misturarmos cuidadosamente, tubos de vidro de 3×100 mm, são cheios até 25 a 30 mm e deixamos solidificar. Uma segunda camada de solução de agar a 1 % é adicionada até a espessura de 5 mm. Depois da solidificação, juntamos uma gota de soro não diluído aos tubos, os quais são colocados na estufa, a 37°, durante 7 dias. Fazemos a leitura pela ausência ou presença de linhas de precipitação, observadas ao fim de 24 horas e anotamos de 4+, 3+, 2+, 1+ ou — consoante o número de linhas.

A aplicação deste método para detectar os anticorpos em doentes tuberculosos foi demonstrado por PARLETT e outros, num estudo

QUADRO I

Quadro resumo dos tests usados na diferenciação das micobactérias (1)

		Var. Mycobacterium tuberculosis			Saprófitas	Micobactérias anónimas				
		Humano	Bovino	Aviário		Fotocromogénias Grupo I	Escotocromogénias Grupo II	Não-Fotocromogénias Grupo III	Crescimento rápido Grupo IV	
Características das colónias	Factor corda (2)	+	+	+	-	± cordas soltas	-	-	-	
	Pigmento	Creme amarelo-claro	Amarelo-claro	Amarelo-claro	Amarelo, alaranjado ou vermelho	Amarelo-vermelho-tejolo (só à luz)	Vermelho-alaranjado (à luz ou ao escuro (7))	amarelo-claro	Vermelho-alaranjado ou branco	
Tests bioquímicos especiais	Catalase	+	+	+	-	+++	+++	++	++	
	Test do disco de auramina (3)	+	+	+	-	±	±	±	-	
	Vermelho neutro (4)	Vermelho (9)	Vermelho	Vermelho	Amarelo (5)	Cor de tejolo	Cor de tejolo (algumas amarelas)	Amarelo	Amarelo	
	Tioglicolato (5)	Ausência de crescimento (6 semanas)	Crescimento (4 semanas)	Crescimento (4 semanas)	Crescimento (1-2 dias)	Crescimento (2-4 semanas)	Crescimento (2-4 semanas)	Crescimento (2-4 semanas)	Crescimento (1-2 dias)	
	Niacina (6)	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Patogenicidade para os animais	Rato	+	++	++	-	+	-	+	(algumas +)
	Cobaia	+++	+++	++	-	-	-	-	-	
	Coelho	±	+++	++	-	-	-	-	-	
	Galinha	-	-	+++	-	-	-	-	-	
Notas	Não cresce a 45° ou abaixo de 25°. Cresce melhor a 34-37° em 3-6 semanas.		Não cresce a 45° ou menos de 25°. Cresce melhor a 34-37° em 3-6 semanas.		Cresce a 45° mas não cresce à temperatura ambiente (25°).		Crescimento em 1-2 semanas. Cresce bem à temperatura ambiente (25°).		Crescimento em 1-2 semanas. Crescimento lento à temperatura ambiente.	
	Muito pleomórficas. Formas cobaciares aparecendo frequentemente nas sementíferas. Morfologia das colónias semelhantes às das estirpes humanas. Crescimento em 2-4 semanas. Cresce bem à temperatura ambiente.									
	Crescimento dentro de 1 semana. Cresce bem à temperatura ambiente.									

(1) Este quadro-resumo foi compilado por Captain John N. Albertson, Jr. através da consulta de livros e da sua experiência pessoal. V. DIFCO, ob. cit.

(2) MILDDLEBROOK, G., DUBOS, R. J. e PIERCE, C. J.: Exper. Med. 86:175:1947.

(3) ERLICH, H.: Amer. Rev. Respiratory Dis. 81:218:1960. Vidé DIFCO, ob. cit.

(4) DUBOS, R. J. e MILDDLEBROOK, G.: Amer. Rev. Tuberc. 58:698:1948.

(5) TARSHIS, M. S.: J. Lab. & Clin. Med. 54:630:1959.

(6) MEDVECKY, E.: Amer. Rev. Respiratory Dis. 81:757:1960.

(7) Para a produção de pigmento nestes organismos não é necessário constante exposição à luz. A exposição a uma lâmpada eléctrica de 100 W durante 20-30 minutos é geralmente suficiente para a produção do pigmento. Alguma colónia branca que apareça na cultura deve sempre ser exposta à luz nas condições acabadas de mencionar e subsequentemente examinada para verificar a produção de pigmento. (O exame para a produção do pigmento é feito 4-5 dias depois da exposição à luz).

(8) Estirpes humanas que são resistentes à INH (Isoniazida) são frequentemente negativas.

(9) A cor vermelha indica um test positivo e a cor amarela um test negativo. A cor de tejolo encontrada no Grupo I e no Grupo II das micobactérias anónimas indicam um estado intermédio entre um test positivo e um test negativo.

prévio, usando um antigénio preparado de um filtrado de cultura de uma estirpe avirulenta de *Mycobacterium tuberculosis*. Depois, ensaios mais extensivos foram feitos em soros de doentes com tuberculose, bem como outras doenças por PARLETT e YOMANS.

Também podemos pesquisar os anticorpos circulantes nos tuberculosos por meio da reacção de DUBOS e MIDDLEBROOK segundo a modificação de SPANGBERG e BOYDEN. Esta reacção mereceu entre nós um estudo de TAVARES, e colaboradores que chegaram à seguinte conclusão: «A reacção de hemaglutinação passiva, segundo as técnicas destes autores, não é de valor diagnóstico na tuberculose embora os títulos, observados em doentes, sejam, em média, mais elevados que nos sãos».

Apareceram depois outras reacções, como a de VERNES com a resorcina, TAKATA-ARA com o sublimado etc., sem qualquer interesse.

### XIII — ANTIBIOGRAMA

O *Mycobacterium tuberculosis*, à semelhança das outras bactérias, é susceptível de ser ensaiado, na sua sensibilidade, aos fármacos anti-tuberculosos (\*).

Este problema pode pôr-se no princípio ou durante o tratamento. No princípio, há quem afirme que, muitas vezes, o *Mycobacterium tuberculosis* atacante é proveniente de indivíduos sujeitos a terapêutica intensiva e, portanto, vindo para novo hospedeiro já resistente. Durante o tratamento temos a necessidade de fazer o test para controle da terapêutica e comportamento da resistência aos fármacos (\*\*).

(\*) Além do problema dos ensaios dos tests de sensibilidade há um outro que é o da concentração dos fármacos no sangue após a sua administração. Para o caso particular da INH (Isoniazida), na XVI Conferência Internacional da Tuberculose realizada em Setembro de 1961, em Toronto (Canadá) foi estudado o caso da inactivação rápida daquele fármaco.

Verificou-se, que a taxa de isoniazida no soro não se mantém da mesma maneira, em todos os indivíduos, nas horas que se seguem à administração duma dose do produto. Alguns indivíduos são «inactivadores rápidos», isto é, a taxa activa do medicamento diminui rapidamente, outros são «inactivadores lentos» porque conservam mais tempo no seu soro uma taxa activa de isoniazida. Existe ainda os «inactivadores intermédios ou médios».

Este comportamento dos doentes ao fármaco foi demonstrado que está relacionado com o factor genético, em que 40 % dos indivíduos são inactivadores rápidos, 50 % inactivadores lentos e 10 % inactivadores médios.

A inactivação lenta aparece como um factor genético recessivo enquanto que a inactivação rápida é um caracter dominante. Os inactivadores rápidos e os inactivadores lentos são homozigotos, enquanto que os inactivadores médios são heterozigotos. O comportamento dos indivíduos está também dependente da raça.

A associação da INH com PAS aumenta a isoniazidemia activa, sobretudo se os dois medicamentos são administrados por via endovenosa (XVI Conferência Internacional da Tuberculose: O problema da inactivação rápida da INH. La Presse Médicale 13:639:1962).

(\*\*) A Liga Francesa para o Combate à Tuberculose aconselha que o tratamento seja feito simultaneamente com 3 fármacos anti-bacilares para evitar o fenómeno de resistência e o controle do tratamento pela execução de antibiograma de 6 em 6 meses.

O antibiograma do *Mycobacterium tuberculosis* pode ser efectuado por duas vias: directa e indirecta.

Na titulação directa o produto é semeado, após homogeneização, nos meios de cultura contendo as várias concentrações do antibiótico em estudo, ao passo que, na titulação indirecta, só depois do isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* do produto patológico é que se ensaia a sensibilidade.

O método directo é mais rápido e apresenta as seguintes vantagens:

- 1.º — Economia de tempo e trabalho.
- 2.º — O resultado poder ser lido ao fim de 2 semanas.
- 3.º — Estabelecer uma avaliação mais aproximada de bacilos tuberculosos, resistentes numa população bacilar examinada.

Claro que há condições para que se faça a titulação directa, isto é, que o produto em análise apresente, no exame directo, uma certa riqueza corresponde à escala de GAFFKI n.º III ou IV.

Pode um produto nestas condições, depois de efectuado o test, ser rejeitado. É necessário que as culturas nos tubos testemunhas compreenda um número de colónias entre 20 a 50. Caso contrário, a medida directa da resistência não pode dar uma informação válida. Na prática corrente, uma medida indirecta não será efectuada a não ser que o número de colónias no tubo testemunha seja inferior a 25 ou 50. Isto é, a titulação indirecta faz-se sempre que um produto é paucibacilar.

Sem qualquer discussão, está provado na prática que o melhor processo para a execução de um antibiograma é empregar um meio sólido como o de LOWENSTEIN-JENSEN com 0,75 % de glicerina, impregnado de antibióticos. Esta impregnação dá-se antes ou depois da coagulação, consoante o antibiótico em questão.

A União Internacional Contra a Tuberculose estabeleceu as concentrações que devem ter os meios de cultura, mas o certo é que os laboratórios preparadores empregam outras concentrações, como podemos ver no Quadro II.

QUADRO II

Antibiótico	Concentração em mcg./l		
	DIFCO	OXOID	U. I. T.
Estreptomina	10-100-250	1-3-10-30	4-16-64
Hidrazida	0,2-1-5	0,2-1-5-10-50	0,4-1,6-6,4
PAS	—	2-10-50	0,08-0,32-1,28
Estreptomina + PAS	10 + 100 100 + 100	—	—
Estreptomina + INH	10 + 5 100 + 5	—	—
Nipasic	—	0,2-1-5-50	—
Nupa-Sal	—	0,2-1-5-10-50	—
Viomicina	10-100-250	—	—

Os laboratórios preparadores, a pedido, preparam meios com outros antibióticos tais como: Cicloserina, (\*) Kanamicina, Ethionamida, Thiosemicarbazonas, Viomicina, etc.

Para a execução do test, devemos dispor de dois tubos testemunhas, isto é, meio de Lowenstein-Jensen glicerinado, sem adição de antibiótico, e, para cada farmaco, dois ou três tubos impregnados do agente terapêutico nas várias concentrações.

A presença dos tubos testemunhas têm duas finalidades:

1.º — Verificar se o número de colónias está compreendido entre 20 a 50, e, portanto, dar-nos a validade do test.

2.º — Verificar se nos dois tubos testemunhas há igual número de colónias, como prova de que o produto semeado se apresenta convenientemente espalhado.

A técnica para a execução do antibiograma é fácil. Em primeiro lugar, procedemos à homogeneização alcalina para provocarmos um enriquecimento bacilar e destruição da flora conjunta. Se vamos fazer o exame directo, semeamos para cada tubo igual número de gotas do produto homogeneizado tanto para os tubos testemunhas como para os tubos impregnados de antibióticos. Se recorrermos ao test indirecto, primeiramente temos de isolar o *Mycobacterium tuberculosis* e depois fazer a sementeira em meio de Lowenstein-Jensen, glicerinado, nos tubos com agentes terapêuticos e nos tubos testemunhas.

No test indirecto a quantidade a semear é importante. Está indicado que seja o equivalente ao peso húmido de 1 mg de colónias por ml. Para isso, deitamos para um vidro de relógio esterilizado um certo número de colónias e pesam-se em balança eléctrica. Sejam 11 mg. Passamos as colónias para dentro de um almofariz esterilizado e juntamos água destilada esterilizada, gota a gota, mexendo bem para distribuir os bacilos. Depois fazemos a diluição respectiva (0,1 cm<sup>3</sup> + 9,9 cm<sup>3</sup> de água destilada estéril). Desta suspensão, deitamos III gotas em cada meio.

Esta técnica é perigosa e procura-se outra. Uma delas é cultivar o *Mycobacterium tuberculosis* em meio líquido de DUBOS com Tween 80 a fim de se obter um crescimento facilmente difusível. Centrifugamos e suspendemos o sedimento em soro fisiológico esterilizado. Acertamos a suspensão, turbidimètricamente, a 1 mg de bacilos por ml, usando uma suspensão padrão de BCG ou uma suspensão apropriada de sulfato de bário (1,7 ml de cloreto de bário, a 1 %, + q. b. p. 100 ml de ácido sulfúrico normal), ou seja, a escala n.º 1 de Mac-Farland. Esta turvação é equivalente a um tubo de 22 mm de diâmetro por forma que, colocado sobre um jornal, possamos ver as letras, mas não identificá-las nitidamente.

Outro processo é suspender o maior número de colónias em cerca de 4 ml de soro fisiológico esterilizado, num balão de vidro de 40 ml de capacidade de fundo redondo, contendo umas doze pérolas de vidro.

(\*) Este antibiótico é termolábil e como tal não pode ser impregnado no meio de LOWENSTEIN-JENSEN antes da coagulação. Deste modo recomenda-se a impregnação do fármaco depois da coagulação.

Homogeneizamos num agitador do tipo KHAN durante 1 hora e acertamos a suspensão como anteriormente. O que interessa em qualquer dos casos é que os bacilos se encontrem convenientemente dispersos.

Em vez dos meios sólidos há quem prefira fazer o antibiograma empregando o meio líquido de DUBOS tendo em dissolução os vários antibióticos. Incubamos a 37-38° e os tubos são examinados a partir dos oito dias.

A medida indirecta em meio líquido de DUBOS não dá os ensinamentos sobre a população de bacilos resistentes. Além disso, no meio líquido de DUBOS, com ou sem Tween, os resultados são diferentes, porque o desenvolvimento bacilar faz-se diferentemente. Não podemos igualar a precisão que dão os meios sólidos visto que se trata de fixar as proporções de bacilos resistentes às diferentes concentrações de antibióticos presentes numa população bacilar dada.

A vantagem que os meio líquidos, entretanto, possam apresentar sobre os meios sólidos é que a leitura se pode fazer mais cedo.

A medida indirecta da resistência em meios sólidos, se é mais rigorosa que a do meio líquido, é menos precisa que a medida directa, porque nos dá dados sobre a proporção de bacilos resistentes, apresentados na cultura semeada e não no produto patológico tal como é recebido no laboratório.

Quando o test indirecto é efectuado a partir duma cultura muito pobre, não compreendendo senão raras colónias (uma dúzia por exemplo), as informações que se podem tirar têm um valor muito limitado, da ordem daquela que daria, nestas condições, uma medida directa.

Por todas estas razões, a medida directa deve ser preferida, sempre que seja possível, isto é, cada vez que o produto seja pouco rico em bacilos, à medida indirecta que exige pelo menos menos 6 a 8 semanas de execução.

O antibiograma por difusão dos discos de antibióticos em caixas de Petri, contendo o meio de Lowenstein-Jensen glicerinado, já não se utiliza nos laboratórios, porque não permite tirar conclusões tão rigorosas como o processo dos meios culturais impregnados de farmacos anti-tuberculosos.

Vejamos a interpretação do test. É uma questão delicada essa interpretação e a resposta a dar ao clínico. Podemos arranjar uma classificação de «sensível», «pouco sensível» e «resistente». Outras podemos arranjar consoante o número de tubos ou concentrações.

Assim, um farmaco diz-se «sensível» quando impede o desenvolvimento de colónias de *Mycobacterium tuberculosis* e, «resistente» no caso contrário. Assim, se há crescimento só nos tubos testemunhas, dizemos que o fármaco em questão é «sensível». Se há colónias nos tubos impregnados de agente terapêutico, podemos classificar a sensibilidade pelo número de colónias em relação aos tubos testemunhas. Deste modo, se há algumas colónias no tubo de concentração mais baixa, dizemos que o farmaco em estudo é «pouco sensível». Se há colónias em tubos de concentração maior, dizemos que é «resistente». Em regra, bastam somente dois ou três tubos do agente terapêutico para o estudo do antibiograma.

## QUADRO III

## ANTIBIOGRAMA PARA O «MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS»

Nome do doente:  
 Morada:  
 Produto em análise:  
 Exame directo:  
 Densidade dos bacilos:  
 Test: | Directo  
 | Indirecto  
 Início do test: ...../..... 19.....  
 Leitura do test: ...../..... 19.....  
 Meio de cultura de Lowenstein-Jensen com 0,75 % de glicerina preparado pelos Laboratórios .....

## ANTIDIAGRAMA

	1.ª SEMANA (ou data)	2.ª SEMANA (ou data)	3.ª SEMANA (ou data)	Classificação da sensibilidade
Meio de L. J.				Testemunha
Meio de L. J.				Testemunha
Meio de L. J. com estreptomicina:				
1 mcg/ml				
3 —				
10 —				
30 —				
Meio de L. J. com isoniazida:				
0,2 mcg/ml				
1,0 —				
5,0 —				
5,0 —				
10,0 —				
30,4 —				
Meio de L. J. com PAS:				
2 mcg/ml				
10 —				
100 —				

Conclusões:

.....

.....

Os laboratórios OXOID (\*), à semelhança do que seguem os analistas do Reino Unido, consideram o bacilo da tuberculose «sensível» se o crescimento consistir em menos de 20 colónias.

(\*) Comunicação pessoal em 26/2/62.

É insuficiente responder ao clínico que o bacilo da tuberculose é «sensível» ou «resistente» a determinado farmaco. Convém, para estudos comparativos futuros, incluir no boletim o número ou o aspecto das colónias dos tubos testemunhas e dos tubos impregnados de agentes terapêuticos (aspecto de toalha contínua, confluentes, picotados, etc.), ou então, traduzir o resultado em percentagem relacionado com os tubos testemunhas.

Para um maior rigor, podemos utilizar estirpes «standard» como a E5, fornecida pelo Instituto de Patologia de Compenhague da Dinamarca da direcção do Prof. JENSEN, e a H37 Rv, fornecida pelo Trudeau Laboratory, de Trudeau, N. Y. — U. S. A., da direcção de M. W. STEENKEN Jr. Neste caso, convém acentuar quantas vezes a cultura em estudo é mais «sensível» ou «resistente» que a estirpe padrão.

Finalmente apresentamos no Quadro III, o esquema de um boletim de análise para ser entregue ao médico assistente.

### BIBLIOGRAFIA

(Indicamos somente a referente a autores portugueses)

- (<sup>1</sup>) ALEMQUER, M.: *Sobre o tratamento da tuberculose pulmonar*. Tese. Lisboa 1957.
- (<sup>2</sup>) DAVID, H. L.: *J. Soc. Cienc. Méd.*, **125**, 91 (1961).
- (<sup>3</sup>) DAVID, H. L.: *Tese licenciatura*. Lisboa 1958.
- (<sup>4</sup>) DAVID, H. L. e ALEMQUER, M.: *Acta Tub. Scand.*, **39**, 172-195 (1960).
- (<sup>5</sup>) DAVID, H. L., CARDOSO, A. e ALEMQUER, M.: *Comp. Rend. Sc. Sc. Biol.*, **104**, 222 (1960).
- (<sup>6</sup>) DAVID, H. L., RAMALHO, M. O. e ALEMQUER, M.: *Actividades*, N.º 12 (1960).
- (<sup>7</sup>) DAVID, H. L. e RAMALHO, M. O.: *J. Soc. Cienc. Méd.*, **126**, 211 (1962).
- (<sup>8</sup>) FIGUEIREDO, A.: *Verificação da sensibilidade do Mycobacterium tuberculosis*. Lições do 2.º Curso de Férias de Análises Clínicas. Coimbra 1960.
- (<sup>9</sup>) LEANDRO, L. J.: *J. Soc. Cienc. Méd.*, **126**, 44 (1962).
- (<sup>10</sup>) PIMENTEL, C.: *J. Soc. Cienc. Méd.*, **125**, 427 (1961).
- (<sup>11</sup>) RAPOSO, J. M.: *Coimb. Med.*, Fasc. VII (1959).
- (<sup>12</sup>) RAPOSO, J. M. e QUEIRÓS, A. V.: *Pesquisa dos bacilos ácido-resistentes. Valoração de um método*. Not. Farm. (sep.) Coimbra (1959).
- (<sup>13</sup>) SANTOS, M. S.: *Bol. Esc. Farm.*, **13-14**, 42 (1953-54).
- (<sup>14</sup>) SANTOS, M. S.: *Bol. Esc. Farm.*, **1**, 41 (1957).
- (<sup>15</sup>) TAVARES, A. S., SOUSA, A. e MAGALHÃES, J.: *Port. Med.*, **45**, 168 (1961).
- (<sup>16</sup>) VAZ, J. M.: *Port. Med.*, **42**, 149 (1958).
- (<sup>17</sup>) VELOSO, F.: *Arq. Tis.*, N.º 4 (1956).
- (<sup>18</sup>) VIDAL, C. e CARVALHO, A.: *Imp. Méd.*, **6**, 14 (1940).
- (<sup>19</sup>) VIDAL, C., VILLAR, T. ROCHETA, J. e CARVALHO, A.: *Contribution à la recherche du bacille de Koch dans l'estomac*. Lisboa 1942.
- (<sup>20</sup>) VIDAL, C. e CARVALHO, A.: *Contribution pour la différenciation des types du bacille de la tuberculose*. Lisboa 1940.
- (<sup>21</sup>) VIDAL, C.: *La recherche du bacille de Koch dans les selles*. Lisboa 1938.
- (<sup>22</sup>) VIDAL, C. e CARVALHO, A.: *Sur la virulence des bacilles de Koch obtenus par sondage gastrique chez les tuberculeux pulmonaires*. Lisboa 1945.
- (<sup>23</sup>) VIDAL, C., CARVALHO, A. e ROCHETA, J.: *Sur la virulence du bacille de Koch dans les matières fécales*. Lisboa 1938.
- (<sup>24</sup>) VIDAL, C.: *Contribuição para o estudo da virulência do Bacilo de Koch*. Tese de doutoramento. Lisboa 1944.
- (<sup>25</sup>) VILLAR, T. e DAVID, A. M.: *Gaz. Med. Port.*, **13**, 122 (1960).
- (<sup>26</sup>) VILLAR, T. G.: *A importância da relação entre os gânglios linfáticos e a árvore brônquica na tuberculose pulmonar na criança e no adulto*. Coimbra 1957.

## ALGAS INDUSTRIALIZÁVEIS PORTUGUESAS (\*)

JÚLIO DA FONSECA LOURENÇO

Licenciado em Ciências e Farmácia pela Universidade de Coimbra

## PRÓLOGO

*A procura que teve o meu trabalho sobre colóquios das Algas Industrializáveis Portuguesas, realizado nas Universidades de Lisboa e Coimbra, foi de tal ordem, que só tenho de louvar e agradecer a ideia de a Direcção do Sindicato Nacional dos Farmacêuticos, resolver a sua publicação depois do meu Colóquio ali realizado.*

*Chamo a atenção, principalmente, dos meus Colegas Farmacêuticos, para tão grande riqueza espalhada ao longo da nossa Costa, pois ninguém melhor do que eles, com os seus conhecimentos botânicos, a poderão aproveitar.*

*Para explicar o atraso em que vivemos, é hábito não reconhecer as responsabilidades que nos cabem de nada fazer de construtivo para bem do País, preferindo-se inculpar os governantes. Como é preciso bem informar para bem servir, estou certo que ninguém apresentou este problema das algas tal qual existe entre nós, estando, portanto e por isso, ainda à espera de resolução.*

*Atrevo-me, por consequência, a lutar por um maior conhecimento da nossa Flora Marítima, luta que cheguei a temer só por ser honesto e sincero nas minhas afirmações e nunca me desviar daquilo que a consciência me ditava. Só assim satisfaria os meus desejos de bem servir a minha Terra, para não deixar estragar tanta riqueza, cujo montante inclinaria fortemente o fiel da nossa Balança Comercial no sentido positivo. E porque assim penso, não dei ouvidos aqueles que, conforme as suas conveniências, umas vezes me aconselhavam a dizer que se dispunha de muitas algas e outros me pediam para dizer o contrário.*

*Se a industrialização do País não é só para uma geração, não devem estranhar, que, quando aqueles que como eu subiram a encosta da vida, gostem de deixar alguma coisa de construtivo para os vindouros.*

*É preciso que todos saibam, como dizia um grande químico, que há duas coisas no Mundo de que se pode extrair tudo: carvão e algas.*

*Se em moldes de linguagem simbólica se pode dizer que, enquanto as necessidades dos produtos delas extraídos, crescem em progressão*

(\*) Realizado nas Universidades de Coimbra, Lisboa e no Sindicato Nacional dos Farmacêuticos (Janeiro de 1962).

geométrica, a sua produção aumenta simplesmente em progressão aritmética, devemos olhar este assunto com carinho, visto não faltar matéria-prima entre nós, considerando as algas produto de alto interesse nacional, como fez a Espanha, que com menos massa agarófita, delas tira muitíssimo mais rendimento.

De facto a sua industrialização e aproveitamento é dos factores principais para o bem do nosso País. Até a jovem república da Indonésia assim o reconheceu, pois o seu Banco de Fomento prestou o primeiro auxílio à industrialização das algas, para que estas ali sejam laboradas e não exportadas para o Japão como antigamente acontecia.

Diz-se que um País só é pobre ou rico conforme aproveita sua riqueza.

A perda desta, em algas, durante os últimos anos, pode elevar-se a muitos milhares de contos, visto termos matéria-prima para tal.

Referimo-nos às algas agarófitas. E as carreginófitas e alginófitas que entre nós também abundam?

No Japão, país agarófito por excelência, há muitíssimas fábricas de agar-agar para que nada se perca. A Espanha fez o mesmo, com fábricas modestas para tudo laborar. Nós fechamos os olhos a esta riqueza, não tirando da nossa Flora Marítima os produtos que ela nos oferece e que ocupariam um dos primeiros lugares na nossa exportação.

De agradecer ao sr. Presidente da Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos, Dr. Marques Mano de Mesquita, as facilidades que sempre me concedeu para poder trabalhar, com o desejo de pôr ao de cima a verdade, mostrando assim o grande interesse que dedica aos problemas da sua jurisdição.

Ao sr. Dr. Luís Pedro Pinto de Campos, Vice-Presidente da mesma Comissão Reguladora, que me honrou com a sua presença nos meus Colóquios, presto as minhas homenagens.

Não terão grande valor estes apontamentos recolhidos de trabalhos publicados e da observação directa, mas pelo menos farão um pouco de luz para se tornar conhecida esta grande riqueza que tão desprezada tem sido até hoje.

★

Ao tratar deste assunto, principiarei pela coisa mais importante que há no mundo: a CLOROFILA. Sem ela não haveria alimento e portanto não haveria vida. Como apareceu a primeira vez nas algas, cujo interesse vai aumentando cada vez mais, pelo uso industrial ser cada vez maior, é justo que dediquemos a devida atenção a estes seres vivos que primeiro realizaram a fotossíntese.

Mas antes, citarei alguns nomes que me levaram a tomar a resolução de falar sobre esta matéria-prima portuguesa de grande valor e que até hoje quase tem sido desprezada.