

se pensa, um momento, no futuro, no nosso país, desta importantíssima indústria que não está, de modo algum, preparada para o tremendo embate, que se desenha, do reinado dos gigantes (*).

NECESSIDADE DE REFORMA DO ENSINO FARMACÊUTICO

É no meio deste alteroso maremoto que a indústria farmacêutica portuguesa terá de erguer-se e é no seio desta indústria (que carece de um esforço ingente de capitais, de tecnicismo, de inteligência — diríamos), que o diplomado farmacêutico terá de se localizar.

A responsabilidade de se lhe atribuir a adequada formação de acordo com o papel que terá o direito e dever de desempenhar demanda uma atenção e urgência que não é de mais realçar.

Uma única medida, entre tantas outras de diversa natureza, nos parece irrefutavelmente aconselhável: a de reorganizar o ensino farmacêutico, mas em moldes de visão ampla, em que se ponham corajosamente de lado pretensões anacrónicas e se apreenda a marcha irrepreensível do evoluir, estabelecendo, como premissa, *uma formação básica sólida e especializações devidamente aprofundadas*. Ao Professorado de Farmácia, naturalmente a todos quantos directa ou indirectamente vierem a intervir nessa magna realização, compete a responsabilidade do apetrechamento técnico nacional numa indústria de tamanha importância e a sobrevivência do nome farmacêutico português.

Este grito de necessidade das ciências básicas ouve-se, aliás, por toda a parte.

Esta necessidade tem sido, por outro lado, assinalada não só para o farmacêutico da indústria como para o próprio farmacêutico hospitalar.

No órgão oficial da Sociedade Americana dos Farmacêuticos Hospitalares, lia-se: «*A American Society of Hospital Pharmacists* preconiza a urgência de que aos estudos nas ciências básicas seja dado um mais elevado nível nas escolas de farmácia (120').

Queremos dar uma nota contrária a qualquer opinião que se pretenda generalizar no sentido de geito ou ânimo de, assente em qualquer argumentação mais ou menos aparentemente válida, procurar que o curso básico seja reduzido.

A afirmação de que um curso básico prolongado pode afastar os candidatos a matricularem-se no curso não dispõe de validade em si. Já ao criar-se a dualidade de cursos em 1932 se referia que, em presença de um curso de 3 e outro de 5 anos, muito poucos procurariam tirar a licenciatura. Felizmente, o vaticínio não se cumpriu e viu-se que a circunstância do curso ser mais longo não serviu, pelo facto em si, para afastar os candidatos. Em rigor, antes ao contrário, excluindo a tentadora facilidade de um curso de via reduzida para aqueles que se matriculam no curso sem a convicção do gosto e da finalidade de tirarem Farmácia, seduzindo-lhe apenas a facilidade de aluguer do diploma — ao contrário dizíamos nós — a existência da facilidade de um curso reduzido, torna-se antes motivo de afastamento da profissão de candidatos que avaliariam antes ingressar num curso não curto, mas cujo diploma, no final, fosse, compensativamente, prestigiado e bem remunerado.

Este o âmago da questão: valorize-se e prestigie-se o curso, de sorte aos seus diplomados encontrarem uma bitola de remuneração equiparável ao dos engenheiros e não teremos de nos queixar de que não melhora não só o número como o próprio estofa qualitativo dos candidatos, ainda mesmo, e em parte por isso mesmo, tendo-se o curso alongado.

(*) As estatísticas referem, na realidade, que vários pequenos países europeus exportam especialidades e drogas medicamentosas (Suíça, Holanda, Suécia, Dinamarca, Noruega, Roménia, Bélgica, Luxemburgo, etc. (122) e até o nosso país: no entanto, para aguentar este tremendo embate que se está esboçando poucos dos pequenos (Suíça, Holanda, e pouco mais) estão estruturados de modo a poder resistir...

Aliás, o problema, tem sido repetido, um tanto, por toda a parte.

Quando há cerca de 1 ano e tal o Governo Brasileiro se propôs resolver a crise de falta de farmacêuticos reduzindo o curso, uma escola de Farmácia gosando de independência, salvo erro a da Universidade de S. Paulo, não só manteve como aumentou o número de anos do curso. A afluência a este curso prestigiado foi a resposta a uma tal medida.

Na Itália, quando para prestigiar o curso de Farmácia, se criou, lado a lado, a «láurea» em Farmácia (o doutoramento profissional em Farmácia), somente este curso passou a ter frequência ⁽¹²³⁾.

E se olharmos para a vizinha Espanha, onde o curso é dos mais longos das suas Universidades, de 6 anos, a frequência é enorme.

Tentar um curso básico reduzido é atraíçoar o futuro diplomado, já que não dará satisfação a certas necessidades.

Prestigie-se o curso! Em Espanha, como se já referiu, o curso básico é de 6 anos (tal como a Medicina).

Nem o tempo necessário para as especializações depois deste curso afasta ou esmorece, antes ao contrário, os alunos a frequentá-las. Já há muitos anos, são inúmeros os alunos que depois da sua licenciatura de 6 anos se matriculam na especialização de Bromatologia que funciona em Madrid (aliás, de frequência aberta a outros licenciados) (*).

É desta sorte que o diploma em Farmácia goza de um prestígio no país vizinho verdadeiramente invejável para tantos outros.

A característica especial de uma formação particular que confere ao farmacêutico atingir, embora tangencialmente, vários ramos especializados, exige que a estrutura básica seja suficientemente desenvolvida para ser adequadamente informadora e possibilitadora da complementação aprofundada das especializações.

O PROF. A. DEL POZO, com a sua autoridade e dispondo da múltipla faceta dada pela esclarecida «experiência humana, docente e industrial», deixou bem viva a demonstração da vantagem de um curso farmacêutico básico robusto.

São seus os pesarosos raciocínios que passamos a transcrever:

«Por vezes, ao farmacêutico se condena, a excessiva *extensão* dos seus conhecimentos, considerando-a como factor negativo no que se reporta a *profundidade* dos mesmos. É evidente que tal juízo peca por ligeireza, além de que não tem em conta a *absoluta necessidade* de tal *extensão* em adquirir esse conjunto básico formal imprescindível para ser farmacêutico, isto é, para adquirir, precisamente, o selo diferencial que o capacita para a sua *profissionalidade oficial e industrial*» ⁽¹¹⁷⁾.

Evitamos, natural e compreensivelmente, esboçar a apresentação de quaisquer sugestões.

No entanto, sentimos bem que o número de especializações talvez deva ser maior para satisfazer as reais necessidades do que em regra se pensa e a preparação básica terá de ser sólida e capaz, havendo ciências como a química, a bioquímica, e a farmacologia, com todas as disciplinas adstritas, cujos desenvolvimentos terão de estar particularmente presentes na mente do legislador.

Quando pensamos nesta formação básica, não consideramos, evidentemente, a necessidade real e actual da reduzida actividade farmacêutica de oficina, mas nas actividades profissionais asseguradoras do nome do farmacêutico como um licenciado e, como é compreensível, particularmente na perduração do lugar de destaque deste profissional na Indústria Farmacêutica.

(*) Em 18 de Junho de 1962 criou-se, em Espanha, mais uma especialização para farmacêuticos depois do curso: o Curso da Especialidade de Farmacologia na «Escola Profissional de Farmacologia» na Faculdade de Medicina de Barcelona (para formados em Farmácia, Medicina ou Veterinária) (124).

O problema que esboçamos no nosso tema, ou seja a apreciação do farmacêutico nos quadros da indústria tem começado a ser considerado nos últimos tempos em diversas conferências e trabalhos, apreciado em diferentes países, por vezes, por nomes prestigiosos do meio farmacêutico.

Como é natural, dada a estreita dependência do ajustamento do ensino profissional farmacêutico às novas exigências da era da farmácia industrial, muitos desses pontos apreciados dizem respeito à estrutura do curso de farmácia e os seus autores ocupam lugares na cátedra.

Assim, por exemplo, em França, M. H. PENAU pronunciou uma notável conferência, no Instituto Industrial de Farmácia de Montpellier intitulada «Formation des cadres et disciplines industrielles dans l'industrie pharmaceutique» (125).

M. P. LAROUX de Paris pronunciou uma conferência na *Journée Scientifique*, realizada em 28 de Março do ano transacto, no Instituto de Farmácia de Liège, considerando «Des carrières offertes au pharmacien par l'industrie pharmaceutique» (84).

O problema oferece, como é natural, uma feição universal e por isso tem sido ultimamente abordado mais ou menos por toda a parte.

Na França, em 1962, fazem-se estudos e são apresentadas sugestões pelo Instituto de Farmacotecnia e Farmacodinamia da Faculdade de Farmácia de Paris e um projecto é proposto pela Assembleia da Faculdade de Farmácia de Strasbourg. Em ambos os casos, se considera, necessariamente, a especialização de farmacêutico da indústria (além das de farmacêutico de oficina e farmacêutico biólogo) (126).

Por toda a parte se sente a necessidade de desenvolver uma educação e formação para a indústria farmacêutica (*).

Na Faculdade de Farmácia de Paris professa-se ensino destinado a preparação para a investigação científica com orientação industrial. Trata-se de cursos de síntese orgânica, de farmacodinamia e controlo de medicamentos.

Em França, porém, é particularmente a Faculdade de Montpellier que se tem interessado pela formação de farmacêuticos destinados à indústria, através do «Instituto de Farmácia industrial de Montpellier (I. P. I. M.)», criado em 1956, e que é frequentado não só por farmacêuticos franceses como também estrangeiros (além de estudantes de farmácia) (127).

O *Institut de Pharmacie Industriel de Montpellier* é um organismo colocado sob a égide da Universidade, da Indústria farmacêutica e do Ministério da Saúde Pública e tem dois objectivos principais: «a formação de pessoal de Direcção e dos Quadros Técnicos para as necessidades da indústria farmacêutica (art. I dos Estatutos) e a iniciação industrial dos funcionários encarregados do controlo desta indústria» (**).

da Ordem dos Farmacêuticos

(*) Aliás, manifestações sobre estudos dos diversos problemas que afectam a evolução desenvolvem-se e multiplicam-se por toda a parte. Propositadamente, queremos apenas assinalar o que se tem feito no país vizinho e irmão, de franca progressividade neste ramo industrial.

Em Barcelona, realizou-se em 1961 a *I Convención Bional da Indústria Farmacêutica* (134), indo realizar-se a II Convención próximo em Madrid.

Ainda na capital catalã, publica-se, regularmente, uma revista bimestral desde 1958 — precisamente designada «Indústria Farmacêutica» — que trata, aprecia e estuda os diversos problemas e questões relacionados com esta indústria.

Por toda a parte, se começa a considerar a sério a necessidade de uma formação técnica adequada do farmacêutico para a indústria (131-133, etc.).

(**) Pelo Programa de estudos que possuímos do I. P. I. M., reconhecemos que a aprendizagem que administra se distribui por 2 ciclos de desigual tempo e por dois estágios na indústria farmacêutica. O 1.º ciclo (dito «ciclo longo» ou «ciclo comum») que tem a duração de 6 meses (Out.º a fins de Março) e é comum a todos os alunos, inclui cursos magistrais, conferências, estudos de casos, estudos relativos às matérias do programa as quais dizem respeito a:

- Elementos de matemáticas superiores e de cálculo estatístico;
- Noções de mecânica, de electricidade e de física industriais;
- Farmacotecnia;
- Síntese orgânica;
- Farmacodinamia;
- Estudo industrial das drogas de origem vegetal;

Por aqui e por ali, esboça-se a tendência, dando resposta a uma natural necessidade, de considerar e incluir nos estudos farmacêuticos a especialização que prevê a utilização do farmacêutico na indústria (ou seja a especialização do farmacêutico industrial).

Na Bélgica foi criado um ano de estudos para a carreira do farmacêutico destinado à indústria farmacêutica.

Pela recente reforma do ensino de Farmácia em França (129), o 5.º ano é destinado a especializações, que conferem o certificado de especialista. As especializações são 5, sendo obrigatória a de técnica farmacêutica industrial ou a de técnica biológica. Aliás, como se referiu, na Faculdade de Montpellier professam-se, já há anos, estudos complementares farmacêuticos com características industriais. Por outro lado, em França, existem vários outros Institutos de Farmácia Industrial, além de Montpellier (Paris, Toulouse, Lyon).

A preparação de pós-graduados não especificada em cursos regulares vem sido praticada, já há algum tempo, com destino à indústria farmacêutica, também nalguns outros países, como na Inglaterra e Estados Unidos da América (130).

A Cátedra de Farmácia Galénica da Faculdade de Barcelona, no «Cursillo de Tecnologia Galénica» de Doutorado em Farmácia, desenvolve uma certa formação de carácter industrial (131).

Em Itália a questão tem sido igualmente considerada.

Aliás, o problema consequente à inadaptação do diploma farmacêutico à evolução da indústria farmacêutica é questão que tem sido posta aos espíritos em vários pontos e desde já algum tempo. Em França, por exemplo, já em 1956 no Estágio de Informação que anualmente praticam os Farmacêuticos inspectores na *École Nationale de la Santé Publique* foi dedicada uma sessão inteira à análise e discussão deste problema: existência de diplomados, mas não classificados para este ramo de actividade (132).

As escolas de Farmácia compete — até por que está nisso a sua vantajosa evolução —, esforçarem-se por conseguir a aprovação e desenvolvimento de quadros de disciplinas que permitam ao farmacêutico oferecer serviços qualificados por terem recebido, além da cultura farmacêutica clássica, mais um ensino complementar.

Para evitar a perda, a prazo mais ou menos longo, de uma posição de direito do farmacêutico, nos sectores da Produção e da Pesquisa na Farmácia industrial, necessário se torna que o diploma implique uma formação mais adequada às necessidades e exigências actuais deste ramo de actividade farmacêutica.

O asseguramento dos quadros da indústria farmacêutica é constante e a progressiva evolução de competentes profissionais será a forma única, merecida e

da Ordem dos Farmacêuticos

Legislação farmacêutica industrial;
 Controle físico-químico e bacteriológico das fabricações;
 Contabilidade industrial;
 Inglês Técnico;
 Relações industriais;
 Problemas jurídicos das empresas;
 Organização científica do trabalho e da produção.

No final deste ciclo, segue-se um primeiro estágio (durante 1 mês, em Abril) nos diversos departamentos de Sociedades farmacêuticas francesas ou estrangeiras.

Segue-se um segundo ciclo (designado «ciclo curto» ou «ciclo das opções») que oferece aos alunos a possibilidade de se manterem durante 2 ou 3 meses num laboratório ou num serviço à sua escolha.

As opções em funcionamento dizem respeito a:

- 1 — Síntese orgânica
- 2 — Farmacodinamia
- 3 — Farmacotecnia
- 4 — Controle das fabricações
- 5 — Organização geral das empresas
- 6 — Documentação
- 7 — Inspectorado dos laboratórios farmacêuticos.

Por último, findo o segundo ciclo, os estudantes realizam um segundo estágio industrial de 3 meses (Julho, Agosto e Setembro), podendo ser mais prolongado.

segura, de manter a predominância do farmacêutico numa indústria de características tão especiais.

É esta uma grande responsabilidade que recai sobre o reduzido escol responsável pela persistência do nome farmacêutico, necessariamente, antes de mais, pelas próprias escolas.

Parece-nos que, neste momento, é insofismável que para a sobrevivência do nome do farmacêutico se impõe, como uma necessidade essencial e como uma premente ordem do dia:

Reforma de planos do Ensino Farmacêutico, abrangendo a estrutura dos estudos e dos títulos dispensados. Pelo menos, reforma no sentido de especializações assegurarem o direito de acesso a lugares facultados pelo desenvolvimento das novas facetas por que a actividade farmacêutica imperiosamente enveredou.

A sabedoria estará em adaptar o Curso aos destinos da Profissão, de modo a assegurar que o prestigioso nome do farmacêutico perdure com ocupações, asseguradas, por mérito próprio, na Indústria farmacêutica, onde a produção e distribuição são em escala que transfigura a estrutura ou dispensa da Oficina.

A Universidade deverá preparar graduados especificamente orientados para se poderem desempenhar de particulares missões na Indústria Farmacêutica.

Numa altura em que se procura estabelecer os sistemas e os termos em que deve assentar o controle da qualidade dos medicamentos por todo o mundo civilizado, torna-se de salientar que não subsistem dúvidas de que, como último requisito para cumprimento de eficaz sistema de controle da qualidade, se deve contar com a classe qualificada do manufacturante do produto terminado.

É num mundo com a tecnologia farmacêutica em franca e quase revolucionária evolução e num campo de emulação acirrada que o profissional farmacêutico na indústria há-de exercer, marcar e competir, no futuro próximo que se avizinha. Estamos preparados? Podemos perder tempo? Devemos continuar a sonhar com utopias?

É à meditação de todos os responsáveis que o problema fica posto.

Conscencializemo-nos, de ânimo aberto e com ansia de acertarmos. A Classe tem perspectivas rasgadas para o futuro na medida em que ela própria se superiorizar e, resoluta, consciente e bravamente, se lançar, à conquista justa do Futuro.

É da praxe rematar-se um tema oficial, tirando conclusões.

As ilacções aqui são patentes; destituídas de qualquer pretenciosismo, podemos enunciar:

- 1.º — A Indústria farmacêutica é hoje a maior garantia de que as actividades caracterizadamente farmacêuticas são preduráveis nos tempos actuais.
- 2.º — A Indústria farmacêutica constitui um excepcional campo onde os náveis diplomados podem encontrar satisfação para os seus anseios económicos, técnicos e profissionais e, como tal, uma garantia para a própria actividade das escolas de Farmácia.
- 3.º — Impõe-se — sem o que as duas anteriores conclusões se invalidam — uma adequada remodelação do Ensino Farmacêutico, em que se tenha em conta as reais necessidades da orientação formativa das especializações destinadas à Indústria farmacêutica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) THOMAS, C. J.: The British Pharmaceutical Industry. *Drug & Cosmetic Ind.*, 89, 586 (1961).
- (²) Les Produits Pharmaceutiques en Suisse, *France Pharm.*, 15, 139 (1962).
- (^{2'}) L'Industrie Pharmaceutique Française, *France Pharm.*, 15, 87 (1962).
- (³) L'Industrie Pharmaceutique Néerlandaise, *France Pharm.*, 11, 775 (1958).
- (⁴) L'Industria Farmaceutica Olandese, *Il Farmaco, ed. prat.*, 14, 308 (1959).

- (³) Production of Pharmaceuticals in Italy (Prepared by the Economist Intelligence Unit), *Pharm. J.*, **11**, 181 (1958).
- (⁴) L'Industrie pharmaceutique hongroise, *Produits Pharm.*, **6**, 465 (1951).
- (⁵) Standard of Japanese Pharmaceuticals (Abstracted from J. P. and J. N. F.). Toppan Printing Co., Ltd. Tokyo. Japan. 1958.
- (⁶) L'Industrie Pharmaceutique de la Chine, *France Pharm.*, **11**, 781 (1958).
- (⁷) LIU, T. C.: New China's Pharmaceutical Industry, *Pharm. J.*, **1**, 459 (1958).
- (¹⁰) Les Produits Pharmaceutiques en Australie, *France Pharm.*, **15**, 137 (1962).
- (^{10^a}) STEIN, E.: Pharmazeutische Erzeugnisse im Außenhandel Schwedens, *Pharm. Ind.*, **23**, 182 (1961).
- (^{10^a}) STEIN, E.: Pharmazeutische Erzeugnisse im Außenhandel der nordischen Länder, *Pharm. Ind.*, **25**, 474 (1963).
- (¹¹) KAZIN, L. E.: Israeli Drug Industry Moves Ahead, *Drug Trade News*, **38**, (n.º 10), p. 10; 18 (1963).
- (¹²) LACHMAN, L.: Devises an automated Tablet coating process, *Drug Trade News*, **38**, (n.º 22), 45 (1963).
- (¹³) SAMYN, J. C.: An Industrial Approach to Suspension Formulation, *J. Pharm. Sci.*, **50**, 517 (1961).
- (^{13^a}) RENNER-MADA, F. H.: Dokumentation in der experimentelle Arzneimittel-forschung Die Lochkartenanlage als Instrument moderner Forschungs-planung, *Pharm. Ind.*, **25**, 113 (1963).
- (¹⁴) LACHMAN, L. e COOPER, J.: A programmed Automated Film-Coating Process, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 490 (1963).
- (¹⁵) RIECKMANN, P.: Die Automation des Dragierens, *Pharm. Ind.*, **25**, 172 (1963).
- (¹⁶) TUCKER, S. J., NICHOLSON A. E. e ENGELBERT H.: Tablet Color Coating with Pigments, *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. ed.* **47**, 849 (1958).
- (¹⁷) WUSTER, D. E.: Air-Suspension Technique of Coating Drug Particles, *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. ed.*, **48**, 451 (1959).
- (¹⁸) OLANDER J. W.: News Facilities and Equipment for radiation Sterili-sation, *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, **17**, 14 (1963).
- (^{18^a}) SINGIZER, R. E. e LOWENTHAL, W.: Enteric film coat by the air suspen-sion technique, *J. Pharm. Sci.*, **50**, 168 (1961).
- (¹⁹) Sterilization by Radiation. A new Irradiation Laboratory for Industry, *Pharm. J.*, **11**, 88 (1958).
- (^{19^a}) GUILLOT, M.: La sterilisation par les rayonnements, *Il Farmaco*, ed. pr., **14**, 605 (1959).
- (^{19^a}) BARUFFINI, A.: Sull'impiego della radiosterilizzazione in campo tecnico farmaceutico, *Il Farmaco*, ed. pr., **15**, 685 (1960).
- (²⁰) Royaume Uni, *Produits Pharm.*, **13**, 494 (1958).
- (²¹) HAEN, P.: 1959 Pharmaceutical Products Parade, *Drug and Cosmet. Ind.*, **86**, 161 (1960).
- (²²) WATT, J.: Development of New Cardiovascular Drugs, Special Report, Subcommittee of Committee on Appropriations, U. S. Senate, 86th Con-gress, May 6, 1959, p. 614.
- (²³) Hinchcliffe Committee: Final Report of Committee on Cost of Prescribing, Ministry of Health, London, 1959.
- (²⁴) *Chemical Week* apud *Amer. Prof. Pharmacist*, **25**, 483 (1959).
- (²⁵) L'Industrie Pharmaceutique Américaine, de *Mustela Gazzette*, através de *France Pharm.*, **11**, 779 (1958).
- (²⁶) SMITH, A.: Special Communication. The Pharmaceutical Industry Report *J. Amer. Med. Assoc.*, **173**, 1654 (1960).
- (²⁷) National Committee Against Mental Illness, Inc.: What are the Facts About Mental Illness? Facts on Major Killing and Crippling Diseases in United States, National Health Education Committee, Inc., New York, 1959.
- (²⁸) SMITH, A.: Mr. Pharmacist: Listen!, *Amer. Prof. Pharmacist*, **26**, 21 (1960).
- (²⁹) BROWN, F. C. (da Schering Corp.), CONNOR, J. T. (de Merck & Co. Inc.), UPJOHN, E. G. (de Upjohn Co.): *Amer. Prof. Pharmacist*, **26**, 24 (1960).
- (^{29^a}) Pharmazeutika in Japan, *Pharm. Ind.*, **24**, 137 (1962).

- (20) The Organization and Practice of Quality Control in the U. S. Pharmaceutical Industry. *Pharm. Ind.*, **25**, 59 (1963).
- (20') BLITHE, R. H.: Opportunities for pharmacist in industry, *J. Amer. Pharm. Assoc., Pr. ed.*, **19**, 362 (1958).
- (20'') VALLÉS P.: Modernas Técnicas de organización industrial aplicada a los laboratórios farmacéuticos, *Galénica Acta*, 137 (1957).
- (20''') ORR, JR., G. W.: Structure of a Pharmaceutical Firm, *Drug & Cosmetic Ind.*, **85**, 308 (1959).
- (21) MARAGALL, J.: Organigramas para la industria farmacéutica, *Industria farmac.*, **5**, 73 (1962).
- (22) MONSERRAT C.: Planteamento de una industria farmacéutica, *Galénica Acta*, **15**, 219 (1962).
- (23) CASTELLAR, R.: Aspectos de organización interior de una industria farmacéutica, *Galénica Acta*, **15**, 165 (1962).
- (24) LAROUX, P.: Des Carrières offertes au Pharmacien par l'industrie pharmaceutique, *Il Farmaco, ed. prat.*, **18**, 3 (1963).
- (25) CONNER J. T.: The Anatomy of Pharmaceutical Research, *Drug & Cosmetic Ind.*, **85**, 462 (1959).
- (26) Cancer. A vasta hunt for anticancer drugs has turned up scores of chemicals with temporary effects but no cures, *Chem. & Eng. News*, **37**, n.º 41, 53 (1959).
- (27) BOGUE J. Y.: The organisation and economics of research in the pharmaceutical industry, *Pharm. J.*, **1**, 27 (1962).
- (28) DAVIES HAINES T. F.: Planing the Research Program of Pharmaceutical Company, *Drug & Cosmetic Ind.*, **78**, 749 (1956); **79**, 46 (1956).
- (29) The Drug Industry, *Chem. & Eng. News*, **38** (n.º 24), 104 (1960).
- (30) ALVAREZ, J. L.: Consideraciones sobre el análisis Farmacéutico, *Galénica Acta*, **15**, 199 (1962).
- (30') New Drug Regulations will Promote. The Fallacy of Generic «Equivalency», *Drug Trade News*, **38** (n.º 13), 30 (1963).
- (30'') AUTIAN, J., e BERMAN, A.: Role of the pharmacist in drug evaluation, *Am. J. Pharmacy*, **134**, 195 (1962).
- (41) POZO, A. e DONATA, F.: La Industria farmacéutica en su aspecto técnico-professional, *Industria Farmac.*, **5**, 119 (1962); *Galénica Acta*, **15**, 245 (1962).
- (42) Art. L 596. Ordenance n.º 59-250 de 4.II.1959. Journal Officiel du 8.II.1959.
- (43) C. F. D. A., n.º 51-52.
- (44) LENZ, W.: Thalidomide, and congenital abnormalities, *Lancet*, **1**, 45 (1962).
- (45) PFEIFFER, R. A., KOSENOW, W.: Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet*, **1**, 46 (1962).
- (46) SPEIRS, A. L.: Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet*, **1**, 303 (1962).
- (47) MORGAN, B. C.: Thalidomide («Distaval») and Foetal Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **1**, 792 (1962).
- (48) TUCHMANN-DUPLESSIS, H.: A propos des malformations attribués a un somnifère, la thalidomide, *La Presse Méd.*, **70**, 1521 (1962).
- (49) MELLIN GILBERT, W. and KATZENSTEIN, M.: The saga of thalidomide. Anomalies, *New England Journ. Med.*, **267**, 1184; 1238 (1962).
- (50) FAIGLE, J. W., KEBERLE, H., RIESS, W. and SCHMID, K.: The metabolic fate of thalidomide, *Experientia*, **18**, 389 (1962).
- (51) WEICKER, H. und HUNGERLAND, H.: Thalidomide-Embryopathie, *Dtsch. Med. Wschr.*, **87**, 992 (1962).
- (52) BECKMANN, R.: Über das Verhalten von Thalidomide im Organismus, *Arzn. Forsch.*, **13**, 185 (1963).
- (53) DEVITT, R. E. F. e KENNY, S.: Thalidomide and Congenital Abnormalities, *Lancet*, **1**, 430 (1962).
- (54) RUSSEL, C. S. e MCKICHAM, M. D.: Thalidomide and Congenital Abnormalities, *Lancet*, **1**, 429 (1962).
- (55) WILLAMANN A. e DUMOULIN J. G.: Thalidomide («Distaval») and Foetal Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **1**, 477 (1962).
- (56) STABLER, F.: Thalidomide and Congenital Abnormalities, *Lancet*, **1**, 591 (1962).

- (57) ROGERSON, G.: Thalidomide and Congenital Abnormalities, *Lancet*, **1**, 681 (1962).
- (58) FERGUSON, A. W.: Thalidomide and Congenital Abnormalities, *Lancet*, **1**, 691 (1962).
- (59) SOMERS, G. F.: Prüfung von Arzneimitteln auf ihren Einfluß auf Fruchtbarkeit und auf teratogene Wirkungen, *Pharm. Ind.*, **25**, 129 (1963).
- (60) KEMPER, F.: Huhnerei-Embryopathien, *Arzn. Forsch.*, **13**, 191 (1963).
- (61) TRUETA, J.: Care of thalidomide babies, *Lancet*, **II**, 1161 (1962).
- (62) SMITHELLS, R. W.: Thalidomide and Malformations in Liverpool, *Lancet*, **II**, 1270 1962.
- (63) WOOLLAM, D. H. M.: Thalidomide Disaster considered as an Experiment in Mammalian Teratology, *Brit. Med. J.*, **II**, 263 (1962).
- (64) WHITE, F. A.: Thalidomide Babies. Memorandum from the British Paediatric Association, *Brit. Med. J.*, **1**, 522 (1962).
- (65) LÉCUTIER, M. A.: Phocomelia and Internal Defects due to Thalidomide, *Brit. Med. J.*, **II**, 1447 (1962).
- (66) FRANKLIN, A. W., Special Article — Thalidomide babies memorandum from the British paediatric association, *British Med. J.*, **II**, 522 (1962).
- (67) WATSON, G. I.: Meclozine («Ancoloxin») and Foetal Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **II**, 1446 (1962).
- (68) POWELL, P. D. e JOHNSTONE, J. M.: Phenmetrazine and Foetal Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **II**, 1327 (1962).
- (69) MOYNAHAN, E. J., Tetracycline in Teeth and Bone, *Lancet*, **1**, 970 (1962).
- (70) ROBSON, J. M. e SULLIVAN, F. M.: The production of foetal abnormalities in rabbits by imipramine, *Lancet*, **1**, 638 (1963).
- (71) Drug Toxicity Foetal abnormalities and imipramine, *Pharm. J.*, **190**, 267 (1963).
- (72) MCBRIDE, W.: Cyclizine and Congenital Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **1**, 1157 (1963).
- (73) FDA Pharmacologist describe method for determining potential toxicity of Drugs, *Drug Trade News*, **33**, (n.º 9), 53 (1963).
- (74) CARTER, M. P. e WILSON, F.: Tetracycline and Congenital Limb Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **II**, 407 (1962).
- (75) BEVELANDER, G., NAKAHARA, H. e ROLLE, G. K.: Inhibition of Skeletal Formation in the Chick Embryo following Administration of Tetracycline, *Nature* (Lond.), **184** (Suppl 10), 728 (1959).
- (76) MENNIE, A. T.: Tetracycline and Congenital Limb Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **II**, 544 (1962).
- (77) CARTER, M. P.: Tetracycline and Congenital Limb Abnormalities, *Brit. Med. J.*, **II**, 544 (1962).
- (78) SOMERS, F. G., Thalidomide and congenital abnormalities, *The Lancet*, **1**, 912 (1962).
- (79) LUTWAK-MANN, C. e HAY, M. F.: Effect on the early embryo of agents administered to the mother, *Brit. Med. J.*, **II**, 944 (1962).
- (80) CHASSAGNE, P. e LECHAT, P.: A propos de l'effet tératogène des médicaments, *Thérapie*, **17**, 743 (1962).
- (81) ROUX, C. e DUPUIS, R.: Action Tératogène du triparanol, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **155**, 2255 (1961).
- (82) ACHOR, WINKELMANN e PERRY, *Proc. Mayo Clin.*, **36**, 217 (1961), apud *J. Amer. Med. Assoc.*, **178**, 1058 (1961).
- (83) LAUGLIN, R. C., CAREY, T. F.: Cataracts in patients treated with Triparanol, *J. Amer. Med. Assoc.*, **181**, 339 (1962).
- (84) PERRY, H. O., WINKELMANN, R. K., ACHOR, R. W. P., KIRBY, T. J.: Side effects of triparanol therapy, *Amer. J. Med. Sci.*, **244**, 556 (1962).
- (85) KIRBY, T. J. et al., Triparanol Cataract, *Arch. Ophthalmol.*, **68**, 486 (1962).
- (86) Council on Drugs: New Drugs and Developments in Therapeutics, *J. Amer. Med. Assoc.*, **178**, 574 (1961).
- (87) Drug warning — MER/29 (triparanol), *Antibiot. Chemoth.*, **12**, 21 (1962).
- (88) ETZENSPERGER, P. et MERCIER, J.: Etude expérimentale de l'accoutumance aux perturbations psychosomatiques et de la dépendance physique provoquées par le d-propoxyphène (Chlorhydrate de d diméthylamino-4-diphényl-1. 2-méthyl-3-propionoxy-2-butane) chez le Singe, *Thérapie*, **18**, 475 (1963).

- (80) Influence of animal strain selection and conditioning on biological experiments and assay. Symposium. London, The Pharmaceutical Press, 1962, pag. 32.
- (90) Clinical Trials. Symposium London, The Pharmaceutical Press, 1962 pag. 83.
- (91) Symposium on clinical Trials. Discussion between physicians and pharmacist, *Pharm. J.*, 1, 322 (1962).
- (92) Symposium on Investigation Drugs presented at Joint Lenim of the Anormal Meeting of the American College of Apothecaries and the American Society of Hospital Pharmacist. Miami Beach, Florida, May 15, 1963.
- (93) Profession, Government, and Drug Industry, *Lancet*, 1, 580 (1962).
- (94) Testing News Drugs, *Lancet*, II, 1048 (1962).
- (95) The drug industry and public safety in Britain, *Nature*, 196, 951 (1962).
- (96) Clinical testing of new drugs in the U. S., *Nature*, 196, 939 (1962).
- (97) Toxicity test on new drugs, *Pharm. J.*, 1, 311 (1963).
- (98) Safety of drugs, *Pharm. J.*, 1, 311 (1963).
- (99) DANNEBERG, P. B.: La investigación farmacológica en la industria farmacéutica, *Munch. Mediz. Wochenschrift* (ed. en esp.), 104, 457 (1962).
- (100) SCHOLZ, J.: El análisis toxicológico de medicamentos en la industria farmacéutica, *Munch. Mediz. Wochenschrift*, (ed. en esp.), 104, 465 (1962).
- (101) HEITE, H. J.: Problemas médicos y metodológicos en la clínica de los medicamentos, *Munch. Mediz. Wochenschrift* (ed. en esp.), 104, 470 (1962).
- (102) Laboratory animals today. Edinburg Evening Meeting, *Pharm. J.*, I, 41 (1963).
- (103) DUNLOP, The Safety of drugs, *Brit. Med. J.*, II, 1487 (1962).
- (104) Safety of drugs, Joint Subcommittee's Final Report, *Pharm. J.*, I, 317 (1963).
- (105) The toxicity of new drugs, Second Todd Lecture, *Pharm. J.*, I, 140 (1963).
- (106) New Drug Investigation, *Drug Trade News*.
- (107) Drug Control Legislation around the world, *Drug & Cosmetic Ind.*, 92, 159 (1963).
- (108) Profession, Government, and Drug Industry, *Lancet*, I, 50 (1962).
- (109) International Pharmaceutical Federation. Symposium on Quality Control, *Pharm. J.*, II, 429 (1962).
- (110) Debate on drug control, *Pharm. J.*, II, 523 (1962).
- (111) Safety of Drugs: Final Report of the Joint Subcommittee of the Standing Medical Advisory Committees, 1963. H.M.S.O. London.
- (112) Safety of Drugs, *Brit. Med. J.*, I, 1029 (1963); Testing New Drugs, *Lancet*, II, 1048 (1962).
- (113) Drug Toxicity. Industry's proposals to joint subcommittee, *Pharm. J.*, II, 522 (1962).
- (114) Sen. Humphrey to continue Scrutiny of F.D.A. Operation, *Drug Trade News*, 38, (n.º 10), 2; 16 (1963).
- (115) Federal Register, p. 179-183, January 8, 1963.
- (116) MILLS, L. C.: The Effect on New F. D. A. Regulations on Clinical Investigation, *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, 17, 10 (1963).
- (117) MEYER, E. L.: Federal Drug Regulations, 1963, *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, 17, 22 (1963).
- (118) FDA regulations on new drugs for investigational use, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, NS3, 128 (1963).
- (119) AUSTIN, S.: Free Trade in Ideas, *Drug Comestic & Industry*, 92, 229 (1963).
- (120) TICE, L. J.: The New Regulation, *Amer. J. Pharmacy*, 135, 4 (1963).
- (120¹) PIKE, M.: Basic Sciences, their need in hospital pharmacy practice, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 16, 333 (1959).
- (121) F D A regulations for testing new drugs may slow down research, *Chem. Eng. News*, 41, (25), 21 (1963).
- (122) NASSE, H.: The world pharmaceutical Trade, *Drugs made in Germany*, 5 (1), 18 (1962).
- (123) COVELLO, M.: Riforma degli studi e valorizzazione della laurea in Farmacia, *Il Farmaco*, ed. prá., 18, 127 (1963).
- (124) Escuela Profesional de Farmacología, *Industria Farmac.*, 6, 47 (1963).

- (125) PÉNAU, H.: Formation de cadres et disciplines industrielles dans l'industrie pharmaceutique — Conférence faite à l'Institut de Pharmacie Industrielle de Montpellier le 11.5.1957.
- (126) A propos de la réforme des études pharmaceutiques, *Prod. Pharmac.*, **17**, 271 (1962).
- (127) Université de Montpellier. I.P.I.M. Institut de Pharmacie Industrielle. Brochure. Causse Graille Costelnau. Montpellier 1962.
- (128) Carrières Pharmaceutiques, *Lyon Pharmaceutique*, **12**, Numéro spécial 1961-62.
- (129) Decret n.º 62/1393, *Journal Officiel* du 29.XI.1962.
- (130) BECKETT, A. H.: Pharmaceutical education in the U.S.A. Training of the research worker, *Pharm. J.*, **II**, 340 (1958).
- (131) Problemas de Organización Industrial Farmacéutica. Publicaciones de la Sociedad Española de Farmacotecnia, Barcelona, Marzo de 1959.
- (132) Étude sur les problèmes concernant «Le pharmacien et l'industrie». Conclusions des travaux effectués au cours du stage d'information des pharmaciens inspecteurs (Septembre 1956), *Prod. Pharm.*, **12**, 274 (1957).
- (133) SOLDI, A.: Farmacia e Comunità europea, *Il Farmaco, ed., prat.*, **18**, 251 (1963).
- (134) 1.ª Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Española. Ponencias, Conferencias y Conclusiones, Barcelona 1961, 352 pp.
- (135) LEVY, G.: Pharmaceutical Formulation and Therapeutic Efficacy, *J. Amer. Med. Assoc.*, **177**, 689 (1961).
- (136) Memorandum des committees on safety of drugs, *Pharm. Ind.*, **25**, 582 (1963).
- (137) GREINER, Tr.: Why we Rarely Know about Drugs, *J. Amer. Med. Assoc.*, **177**, 42 (1961).
- (138) LENDLE, L.: Arzneimittelnebenwirkungen in der Kritik der Pharmakologie, *Münch. Med. Wschr.*, **104**, 61 (1962).
- (139) LITCHFIELD JR., J. T.: Forecasting Drug Effects in Man from Studies in Laboratory Animals, *J. Amer. Med. Assoc.*, **177**, 34 (1961).
- (140) STARR, I.: The Testing of New Drugs and other therapeutic Agents, *J. Amer. Med. Assoc.*, **177**, 16 (1961).
- (141) A propos de «L'innocuité» des médicaments, *Thérapie*, **16**, 502 (1961).
- (142) Laboratory animal today, *Pharm. J.*, **1**, 41 (1963).

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

A DESCOMERCIALIZAÇÃO DE FARMÁCIA DE OFICINA

PROF. ARMANDO LAROZE ROCHA
Director da Fac. de Farmácia do Porto

JOÃO ALVES DA SILVA
Lic. em Farmácia

Entendeu a Comissão Executiva destas Jornadas inserir no seu programa um «colóquio» que subordinou ao tema «A descomercialização da Farmácia de Oficina». Talvez que o pensamento concretizado nesta expressão dificilmente possa vir a ter aquela realidade que se presume ser desejo da Comissão; mas isto por agora não importa; o que não podemos deixar de reconhecer é a sua evidente oportunidade.

Com efeito, pela primeira vez, na longa história da nossa profissão encontramos-nos perante um dilema, que julgamos decisivo para o futuro da farmácia, pelo menos daquela farmácia tal qual ainda hoje a concebemos.

De um lado, a evolução no sentido do Drug Store que vai transformando as farmácias em estabelecimentos com todas as características de organizações meramente comerciais e onde, segundo dizem, a cedência de medicamentos constitui apenas uma pequena fracção das suas actividades. Nestes estabelecimentos, que já não são precisamente farmácias, o público poderá abastecer-se dos mais variados artigos, servem-se bebidas e tomam-se refeições.

Quer isto dizer que a farmácia deixa de existir, como tal, confunde-se e perde toda a sua individualidade; conceito oriundo da América que se vai propagando na Europa; e entre nós, infelizmente parece ter encontrado terreno-fácil. Em oposição a esta linha de rumo, persiste e opõem-se o conceito tradicional, que pretende conservar a farmácia como em estabelecimento específico e cuja actividade deve resumir-se quase exclusivamente à cedência de medicamentos.

Podemos desde já equacionar o primeiro problema deste colóquio.

Deve ou não a farmácia reagir perante esta linha de força que por vezes nos chega a parecer inevitável?

Quais as directrizes que se deverá seguir para que tal reacção venha a ter alguma eficiência?

Deixamos estas perguntas à apreciação dos Excelentíssimos Colegas.

Parece estar fora de dúvidas que o prestígio da nossa profissão tem vindo, desde há já bastantes anos em franco declínio. Vai-se perdendo gradualmente toda aquela reputação de que a farmácia gozou no passado. É uma realidade que todos verificamos, embora tenhamos de reconhecer que alguma coisa encerra de paradoxo.

Na verdade, é justamente durante o período em que o ensino de farmácia atinge o seu grau universitário que se verifica uma descida mais acentuada no conceito social da farmácia, quando seria lógico admitir precisamente uma reacção inversa. E se assim é, creio que tal circunstância nos deveria merecer uma cuidada reflexão a tentar esclarecer os motivos desta e aberrante evolução.

Apontaremos desde já 3 razões que se nos afiguram como as mais responsáveis pelo lamentável estado de decadência da nossa profissão.

Em primeiro lugar, «o abandono das farmácias pelos farmacêuticos»: depois a natureza dos artigos que o público hoje encontra nas farmácias: finalmente a actual estética dos estabelecimentos farmacêuticos.

O abandono das farmácias pelos farmacêuticos

Vai sendo voz corrente, pois que foi já afirmada em público, a argumentação com que se pretende justificar quanto de desnecessário se tornam as direcções-técnicas das farmácias, dado que os farmacêuticos já não preparam os medicamentos que fornecem.

Tenhamos presente aquela campanha jornalística que ainda há bem pouco tempo exhibia uma série de depoimentos em que se chegou ao delírio de se pretender demonstrar quanto de inútil há na preparação científica dos farmacêuticos, sempre que estes exercem a sua profissão numa farmácia.

Nós compreendemos, e muito bem qual a intenção daqueles que calorosamente defendem tal doutrina, compreendemos que no fundo o que se pretende é justificar uma posição de ilegalidade, na esperança de a tornarem legal. Foi necessário criar um clima de confusão onde interesses inconfessáveis, vão encontrando ambiente que muito bem pode ameaçar a nossa independência profissional.

Mas o que mais nos impressionou nesta campanha foi o impudor com que se vexava publicamente uma classe de formação universitária.

Aproveitemos a lição bem, triste lição esta, em que tivemos a plena confirmação do prestígio (pobre prestígio) de que disfrutamos na sociedade em que vivemos. Não resta a menor dúvida que pertencemos a uma geração de farmacêuticos que nem sequer soube manter a reputação que herdou, quanto mais elevá-la ao nível social que merecia.

Na realidade chegou o momento inadiável de nos unirmos, de revermos atitudes e enfrentarmos decididamente todos aqueles êrros, que já tanto têm custado, e que a permanecerem seriamente haverão de ameaçar o nosso futuro profissional. Não podemos continuar a transigir com o procedimento inadmissível de tantos farmacêuticos que continuamente se prestam a encobrir todos os desmandos que se tem verificado no exercício da nossa actividade.

Não esqueçamos que, por detrás de cada ilegalidade está invariavelmente a presença sombria de um farmacêutico.

A circunstância do público ter perdido o contacto com os farmacêuticos fatalmente haveria de gerar um conceito simplista e até pouco lisongeiro da profissão que exercemos.

De facto, mesmo quando se trata do fornecimento de especialidades farmacêuticas, aqueles conselhos que tão frequentemente nos são solicitados deixaram de ser prestados pelos farmacêuticos. A posologia, e maneira de administrar, quantas vezes o mecanismo de acção, as advertências sobre o abuso de medicamentos, não de todo isentos de perigos, os esclarecimentos quando de associações medicamentosas, constituem intervenções, sempre de decidida importância e que deveriam ser da exclusiva atribuição dos farmacêuticos. Estamos já longe da época em que a terapêutica quase assentava em conceitos e observações puramente empíricos, e as drogas então utilizadas na sua maior parte, não possuíam acções farmacodinâmicas bem marcadas.

Porém hoje o problema é muito outro, e grande número de substâncias de uso terapêutico possuem efeitos capazes de alterar certas funções orgânicas não raro com evidente gravidade.

Não se compreende que tais substâncias quer fazendo parte de fórmulas galénicas ou mesmo tratando-se de medicamentos já preparados não estejam sob o control de farmacêuticos.

Aqueles nossos colegas que apenas dirigem as farmácias «in nomine» realmente têm exagerado em demasia o desrespeito pelos mais elementares preceitos deontológicos.

Que crédito poderá merecer hoje a farmácia galénica, ainda que reduzida, se a profissão não é exercida por farmacêuticos?

Que garantia poderão merecer as substâncias químicas e as preparações farmacêuticas existentes nas farmácias se estas não forem devidamente controladas?

Este é o problema dominante da Farmácia em Portugal, se não o resolvermos, não mais haverá forma de nos libertarmos da deprimente situação em que vivemos. Chega a não ser fácil compreender-se como tem sido possível admitir que o exercício da farmácia, entre nós, se mantenha e continui neste estado caótico. Comprovada, como parece estar, a insuficiência da Inspeção do Exercício Farmacêutico, ficamos a pensar se o Organismo que nos representa, não deveria de algum modo encarar este angustioso problema, mesmo condicionado às suas limitações.

Deixamos à consideração dos Excelentíssimos Colegas mais este problema.

A natureza dos artigos que hoje se encontram à venda nas farmácias.

O panorama que neste particular se nos depara constitui, sem sombra de dúvida a plena confirmação do encaminhar da nossa actividade profissional, justamente na linha do Drug Store. Os artigos (é esta a linguagem mais adequada) mais variados, mais variados e menos próprios de uma farmácia são expostos em vitrinas compostas ao gosto de meios feirantes e já não é facto inédito anunciarem-se saldos e preços de liquidação.

Não vale a pena enunciar aquela série interminável de objectos, que hoje o público encontra despropositadamente à venda nas farmácias. O que teremos de decidir neste colóquio é se essa série de verdadeiros desmandos deve ou não continuar. Se chegou a altura de revermos o sentido que vamos imprimindo à actividade das nossas farmácias. Se esta orientação é manifestamente errada, quais as medidas que deveremos tomar para que a farmácia retome a sua verdadeira linha de conduta?

Igualmente deixamos à consideração de V. Ex.^{aa} a análise deste problema.

A actual estética dos estabelecimentos de farmácia.

Sempre consideramos que uma das razões da falta de prestígio, perante o público, cada vez mais acentuada, repousava no facto dos estabelecimentos farmacêuticos terem perdido, por completo, o seu carácter específico e desta maneira confundirem-se com qualquer outro estabelecimento de actividades puramente comerciais. Até aos finais do século passado, o arranjo arquitectónico das farmácias criou-lhes um ambiente de austeridade e de dignidade que o público sentia e respeitava. Fácilmente se aceita que tal ambiente haveria de formar, no mesmo público, uma noção da farmácia igualmente austera.

Porém, desde o começo deste século a arquitectura e o arranjo das farmácias já não mostra qualquer carácter específico e perde-se toda a sua dignidade.

Bem sei que não era possível, nem mesmo desejável que as farmácias tivessem os mesmos estilos que possuíam nos séculos passados.

Cada época tem as suas exigências e cada estilo que surge tem que satisfazer essas exigências. Ora as exigências da época actual quer sejam de carácter puramente estético ou funcional não seriam satisfeitas pelos estilos dos séculos anteriores.

Mas isto, de maneira nenhuma justifica que a farmácia tivesse perdido a sua individualidade. O que importava sobremaneira era ter conservado aquela feição específica que a caracterizou. Sejam quais forem os moldes estéticos o que nos deveria ter preocupado era a permanência de um ambiente próprio e digno da função que desempenhamos. Já não sei quando, nem onde, tive a oportunidade de ler um artigo publicado, se bem me recordo, por um farmacêutico espanhol, em que o autor pretendia definir as razões que possivelmente justificariam a baixa reputação social, que este nosso colega, desiludido sentiu no exercício da sua profissão, quando, pelo contrário se julgava credor de uma melhor estima.

Então, numa curiosa síntese afirmou que os farmacêuticos, não são considerados pelo que são, mas simplesmente pela maneira como estão.

Quer isto dizer que não é fácil alcançar-se uma reputação social, exercendo a nossa autoridade dentro de um estabelecimento aberto ao público. E se reflectirmos, por instantes que seja, sobre a maneira como entre nós os farmacêuticos «estão» bem se pode considerar que o julgamento do público está, pelo menos aparentemente certo. Não resta a menor dúvida que vimos a oferecer um espectáculo profundamente lamentável.

As farmácias em que hoje exercemos a nossa actividade, transformam-se em estabelecimentos totalmente característicos e onde apenas se depara com uma série interminável dos mais variados reclames, criando não aquele ambiente de austeridade como conseguiram os nossos colegas do passado mas um âmbito de pura banalidade infantil.

Parece-nos bem que deveríamos dispensar alguma atenção a este problema de acentuado interesse na evolução da farmácia.

Encaramos apenas 3 aspectos do tema geral deste «colóquio». «A descomercialização da farmácia na oficina», quando muito mais poderiam e certamente deveriam ter sido encarados; mas todos os outros nos pareceram aspectos parciais destas linhas mestras em que teremos de iniciar o renascimento da farmácia de oficina. Mas será possível este renascimento? Se não podermos solucionar estes problemas basilares, tudo o mais será inútil dado que não conseguiremos reconquistar aquele prestígio que é afinal de contas a finalidade deste colóquio.

Antes de deixarmos à apreciação dos Colegas as 3 proposições encaradas desejava propor que este colóquio não terminasse no momento em que abandonarmos esta sala. Pelo contrário deveríamos considerá-lo como o início de uma intensa campanha de doutrinação, pois, em boa verdade o mal de que gravemente padecemos é sobretudo de ordem mental e deontológica.

Qualquer movimento que iniciarmos terá que ser necessariamente persistente e longo. Não é fácil remover as mentalidades que forem capazes de gerar esta decadência em que vivemos.

Seguramente que a nossa herança não é de envejar; o caminho que se vislumbra diante de nós não é, nem fácil nem ameno, antes agreste e penoso. Mas, justamente porque assim é, aqui, estamos reunidos a planear esforços e distribuir trabalhos (*).

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

(*) As proposições apresentadas neste trabalho foram postas à consideração da assistência que, por completo enchia o vasto anfiteatro onde decorreu este colóquio. Estabeleceu-se depois uma animada discussão, tendo sido levantadas numerosas objecções quanto à viabilidade da efectivação dos princípios fundamentais em que foi estruturado o início deste movimento, destinado a descomercializar a farmácia de oficina. Considerou-se e aceitou-se que, na realidade só através de uma revisão da linha de conduta no exercício da nossa profissão se poderá iniciar a reconquista daquela reputação Social que se vai gradualmente perdendo, e que se julgou ser uma das causas primárias da decadência da farmácia de oficina.

Por fim foi nomeada uma comissão de que fazem parte os Professores de Deontologia e Legislação Farmacêutica dos três estabelecimentos de ensino, um representante do Grémio Nacional das Farmácias e outro do Sindicato Nacional dos Farmacêuticos para estudar os caminhos que deverão seguir-se como solução de todos os problemas inerentes à reabilitação da farmácia de oficina.

PROPRIEDADE INDUSTRIAL E FARMÁCIA ASPECTOS CORRELATIVOS

LUÍS DUARTE RODRIGUES

Licenciado em Farmácia

Quando me foi dirigido o convite para dissertar nas II Jornadas Farmacêuticas Portuguesas, sobre marcas e patentes, tomei imediatamente a resolução de não aceitar tal encargo, visto que ele implicava uma preparação jurídica e um conhecimento sobre Direito Internacional que eu não possuía nem possuio. Porém, perante a insistência da Comissão e porque não desejava de modo algum negar-me a colaborar nesta realização, acabei por aceder, esperançado em que a benevolência dos que me escutam será suficiente para verificarem que, ao propor-me tratar deste tema, não tive outro fim senão o de esclarecer alguns e elucidar outros, com os ensinamentos que pude compilar nos trabalhos consultados.

Não vou, positivamente, fazer doutrina nem criticar leis ou códigos, mas sim focar o interesse que têm, para o farmacêutico, as legislações existentes e compará-las com as de alguns países estrangeiros, retirando delas aquilo que nos possa vir a ser útil para o futuro.

Este trabalho não se destina portanto aos eruditos nem aos juristas mas, simplesmente, àqueles que, não podendo por carência de meios ou de tempo dedicar-se ao estudo deste assunto, desejem, no entanto, ter, sobre ele, alguns conhecimentos.

Procurei não ser muito extenso e, por esse motivo, limitar-me-ei a focar simplesmente os pontos que mais directamente interessam, uma vez que está ao alcance de todos a leitura do Código da Propriedade Industrial, onde se encontram, em pormenor, todas as indicações.

A propriedade industrial, segundo Ramella, é o conjunto de direitos garantidos pelas leis aos autores de produções literárias, artísticas, industriais, etc., principalmente no que se refere à utilidade que o autor retira de tais trabalhos.

Estes direitos destinam-se a proteger a exclusividade de execução de ideias novas e originais, tendo em atenção a utilidade material que o autor possa retirar dos seus trabalhos.

Com esta finalidade foi promulgada em Portugal a Lei n.º 1972 de 21 de Junho de 1938, denominada Lei da Propriedade Industrial, que estabeleceu as bases do Código da Propriedade Industrial aprovado pelo Decreto n.º 30 679 de 24 de Agosto de 1940.

No artigo 1.º do Código estabeleceu-se a função da propriedade industrial nos seguintes termos:

«A propriedade industrial desempenha a função social de garantir a lealdade de concorrência, pela atribuição de direitos privativos sobre os diversos processos técnicos de produção e desenvolvimento da riqueza».

No artigo 2.º definem-se os produtos e actividades que são abrangidas, indicando-se no artigo 3.º a quem se aplica o Código.

Na moderna indústria farmacêutica a propriedade industrial adquiriu grande importância quer como meio de promoção de vendas quer como um processo de recuperação dos dispêndios feitos na investigação e desenvolvimento.

São principalmente quatro os capítulos do Código da Propriedade Industrial que interessam ao farmacêutico e que se referem ao registo de marcas, patentes ou invenções, nomes e insígnias, modelos e desenhos industriais.

Antes de entrar propriamente na apreciação destes capítulos achamos conveniente dar uma ideia de marca, patente, nome e insígnia, pois, normalmente, estes vocábulos não são utilizados com a precisão devida.

Marca é um sinal distintivo usado pelo comércio e indústria para identificar e individualizar produtos.

Nome é a designação por que é referido e conhecido qualquer estabelecimento.

Insígnia é um desenho ou sinal figurativo usado para identificação de estabelecimentos.

Patente é um título oficial de uma concessão ou privilégio, referente a uma invenção, que, no fundo, representa um contrato entre o Estado e o inventor — o Estado garante um direito exclusivo temporário e, em troca, o inventor descreve a sua invenção divulgando-a no texto da patente.

Dado o significado de cada um destes vocábulos, iniciarei este trabalho pelo estudo dos dois grandes grupos em que se pode dividir a propriedade industrial.

O primeiro, formado pelas invenções propriamente ditas ou sejam as criações com aplicação industrial (patentes de invenção) e os modelos ou desenhos industriais e o segundo, constituído pelos sinais distintivos dos produtos (marcas) e os sinais distintivos das empresas (nomes e insígnias).

Em Portugal são em reduzido número os trabalhos publicados sobre propriedade industrial, ainda que o incremento da indústria entre nós e no estrangeiro, aliado às grandes concentrações económicas com tendência para os monopólios, torne cada vez mais necessário o estudo das realidades jurídicas da propriedade industrial, o estabelecimento perfeito dos seus conceitos e conteúdo jurídico e a elaboração de uma doutrina esclarecida.

No que se refere a invenções não há quaisquer princípios fundamentais formulados e postos em evidência. Além das disposições legais existe pouquíssima jurisprudência, de uma incerteza confrangedora, devido à carência de matéria doutrinal sobre os determinados assuntos.

Nesta época de renovação e de desenvolvimento industrial esperamos que aqueles que para isso têm competência e felizmente são alguns, contribuam para o esclarecimento desta doutrina, pois não será de mais afirmar que o momento presente é difícil e só com a colaboração e esforço de todos será possível fazer alguma coisa.

Nos artigos 4.º e 5.º do Código indica-se o que pode e não pode ser objecto de patente em Portugal.

Interessa-nos focar especialmente o artigo 5.º que especifica no n.º 3 que não podem ser objecto de patente:

«os alimentos bem como os preparados farmacêuticos destinados ao homem e aos animais, podendo, contudo, ser patenteados os aparelhos ou sistemas do seu fabrico». Podemos acrescentar que, segundo o acórdão do Tribunal da Relação do Porto, de 25 de Novembro de 1953, não constituem segredo de indústria as fórmulas farmacêuticas que por força do Decreto n.º 17 636 têm de ser inscritas na embalagem.

Com a saída do Decreto n.º 41 448, de 18 de Dezembro de 1957, referente à apresentação de novas especialidades farmacêuticas em que superintendem a Direcção-Geral de Saúde sob a orientação da Comissão Técnica dos Novos Medicamentos e da Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos este artigo sofreu alteração, pois deixou de haver liberdade para se apresentarem fórmulas similares sem autorização prévia.

Actualmente não podem ser apresentados mais do que quatro medicamentos de composição idêntica além de que não é possível apresentar especialidades que

não satisfaçam totalmente às prescrições estabelecidas em critério pela Comissão Técnica dos Novos Medicamentos.

Também a referida Comissão não permite a apresentação de associações medicamentosas que não revelem acção específica ou possam ser substituídas pela associação de medicamentos simples já apresentados.

Este critério se por um lado evita a apresentação de inúmeras especialidades e permite ao médico manejar o medicamento nas doses mais apropriadas tem, porém, o inconveniente de conduzir a uma maior despesa do doente, pois geralmente a compra de dois ou mais produtos simples torna-se mais dispendiosa do que a aquisição de um medicamento composto.

Portanto, em Portugal, apesar de, pela doutrina do n.º 3 do artigo 5.º do Código da Propriedade Industrial, não ser permitido patentear produtos e preparados farmacêuticos a sua apresentação encontra-se regulamentada pelo Decreto n.º 41 448, de 18 de Dezembro de 1957.

Também nalguns países europeus se segue política idêntica especialmente naqueles em que, como entre nós, não é permitida a patente de medicamentos mas sim de aparelhos ou sistemas de fabrico.

Estão neste caso a Alemanha, Suíça, Canadá, Japão, Holanda, Luxemburgo, etc., enquanto que, por exemplo, a Inglaterra, a França, a África do Sul, etc., adoptam a patente de medicamentos e processos de preparação.

Na França, uma vez que são possíveis as patentes de medicamentos e processos de preparação, para evitar que a qualidade dos produtos fosse afectada e que os seus preços fossem muito elevados introduziu-se na lei o artigo L 604 que diz:

«Logo que a produção de um medicamento seja insuficiente em qualidade ou quantidade ou o seu preço seja anormalmente elevado, o Ministério da Saúde poderá, se o interesse da saúde pública o exigir, requerer do Ministério encarregado da Propriedade Industrial, depois de comunicação feita ao Ministério encarregado da Indústria Química, a cessão da exclusividade da patente, tendo, porém, o titular direito a uma indemnização».

Portanto, segundo a nova legislação francesa, o Governo pode fazer terminar a exclusividade de uma patente de medicamentos sempre que o medicamento produzido seja em quantidade insuficiente ou em qualidade não satisfatória evitando ainda actos abusivos do detentor da patente.

Isto no que se refere simplesmente ao aspecto da propriedade industrial pois para a apresentação de uma especialidade há que requerer a sua apresentação ao Comité Técnico das Especialidades que apreciará a sua inocuidade, o interesse terapêutico e a novidade, através de um processo em que figura a composição da especialidade, os métodos de verificação analítica, os ensaios farmacológicos e clínicos, as modalidades de apresentação, dosagem, indicações, etc.

Quer dizer, além da patente há que conseguir autorização para se apresentar uma especialidade farmacêutica e só assim será possível proteger o produtor e salvaguardar os interesses da saúde pública.

Em Portugal há que prestar atenção a certas tentativas que podem esboçar-se e que poderão levar a um monopólio prejudicial, pois um laboratório pode reunir-se de qualquer modo a outros para simultaneamente pedirem a apresentação de uma especialidade, que depois será apresentada em verdade somente por um deles, embora os outros aparentemente também a apresentem mas de modo a não terem projecção no mercado. Esperamos que os Organismos responsáveis estejam atentos a fim de se evitarem os inconvenientes que poderiam advir deste possível monopólio.

Em Inglaterra e na França um produto químico ou medicinal pode ser patenteado mas quando os produtos farmacêuticos são constituídos por misturas de produtos já conhecidos a patente não é permitida a não ser que a essa mistura estejam atribuídas novas propriedades medicamentosas até essa altura desconhecidas.

Os ingleses estabeleceram a sua lei de patentes dos medicamentos e processos de preparação baseados nas seguintes razões:

- 1) Encorajamento do investigador
- 2) Indução do inventor à revelação das suas descobertas em vez de as guardar secretas
- 3) Único processo de recuperação das despesas de invenção
- 4) Encorajamento dos investimentos de capital em novos projectos que não seriam proveitosos se vários fabricantes competissem simultaneamente no mesmo campo.

Em países em que a indústria química farmacêutica é particularmente eficiente como nos Estados Unidos da América, França, Inglaterra, Bélgica, Austrália, África do Sul, Israel, etc., tais sistemas estão naturalmente indicados e temos conhecimento de que na própria Itália onde, segundo o artigo 14.º da Lei n.º 1 127, de 1939, não é permitida a patente de medicamentos de qualquer género nem dos processos para a sua produção a grande indústria farmacêutica está a ser vítima de constantes e inúmeras imitações, estando a esboçar-se uma tentativa em larga escala para a modificação da lei das patentes, pois esta concorrência está a afectar grandemente a qualidade dos produtos apresentados, especialmente por parte daqueles com menos possibilidades técnicas, além de não dar qualquer protecção às invenções no campo farmacêutico.

Todas estas considerações foram feitas a propósito de medicamentos ou especialidades farmacêuticas.

No que respeita aos produtos da indústria química em Portugal está estabelecido pelo n.º 4 do artigo 5.º do Código da Propriedade Industrial que não podem ser objecto de patente os produtos da indústria química definidos ou resultantes de elementos definidos, com reacção total ou parcial destes elementos entre si, podendo porém ser objecto de patente os processos de os obter.

Por uma análise pormenorizada dos pedidos de patentes ultimamente feitos para a protecção de determinados métodos químicos, verificamos que por parte do interessado há a preocupação de defender a preparação de um determinado produto segundo o método descrito e evitar que pela introdução de novos núcleos se venham a obter produtos semelhantes com melhores propriedades farmacológicas. Parece-nos ser de aconselhar que os pedidos fossem vistos por uma comissão com conhecimentos profundos sobre síntese química que se pronunciará antes de ser deferida a patente pela Repartição da Propriedade Industrial.

É portanto um ponto a considerar numa futura revisão da lei das patentes, pois de outro modo prejudica-se a verdadeira investigação e evita-se que depois de descoberto um determinado composto ele seja aperfeiçoado ou modificado, o que só viria trazer benefícios à saúde pública.

Temos conhecimento de que em países com legislação semelhante à nossa como por exemplo a Alemanha, se dificulta ao máximo a concessão duma patente especialmente quando esta pretende tomar um aspecto genérico em vez de específico.

O acórdão do Supremo Tribunal de Justiça de 15 de Dezembro de 1959 confirma não poderem constituir objecto de patente de invenção produtos químicos de fórmula precisa resultantes de elementos definidos nas percentagens indicadas, com reacção total ou parcial destes elementos entre si, quando os processos ou meios de os obter são os elementos e percentagens que entram na sua composição.

Em última análise podemos dizer que em Portugal não podem ser patenteados nem produtos químicos nem medicamentos mas sim os processos ou aparelhos para a sua obtenção, como de resto acontece na Alemanha, Holanda, Suíça, Países Escandinavos, Japão, Canadá, Índia, e na maior parte dos países Sul-Americanos.

Este facto, se tem permitido, por um lado, o desenvolvimento da indústria farmacêutica entre nós tem, por outro lado, contribuído para que a verdadeira

indústria química farmacêutica não exista em Portugal o que, de um momento para o outro, nos pode trazer graves inconvenientes.

Actualmente a indústria farmacêutica portuguesa estando atenta à apresentação, nos países mais desenvolvidos, de novos produtos farmacêuticos, logo que disso tem conhecimento, procura as respectivas matérias-primas base, especialmente em Itália onde não impera a lei das patentes e consegue, passado pouco tempo, apresentar as suas especialidades com pequeno atraso das firmas estrangeiras inventoras.

Se a Itália e os outros países nas mesmas condições como a Turquia e a Coreia do Sul passarem a aderir à lei das patentes, a indústria farmacêutica portuguesa será gravemente afectada e só poderá apresentar esses produtos entrando em negociações com o proprietário da patente o que, imediatamente, traz, como consequência, o agravamento dos preços de venda ao público das especialidades farmacêuticas nacionais.

É um problema grave que, quanto a mim, terá de ser considerado com a maior urgência, pois se em Portugal não se pensar a sério na investigação e na indústria química farmacêutica, a indústria das especialidades não pode ter grande futuro.

Antevemos que os laboratórios nacionais, se este estado de coisas se mantiver e a lei das patentes passar a vigorar em Itália e noutros países, pois prevê-se a todo o momento uma unificação legislativa na Europa, só terão a alternativa de se ligarem a laboratórios estrangeiros para apresentarem aqui os seus produtos à custa do pagamento de «royalties», como já estão fazendo alguns, ou negociar as patentes com as firmas inventoras, isto se dentro de pouco tempo a indústria química em Portugal não for uma verdade. Devemos acrescentar que, entre nós, a patente só cairá no domínio público ao fim de 15 anos, contados a partir da data do respectivo título.

Tem-se discutido e parece-nos que o assunto se encontra por esclarecer, se um produto patenteado em qualquer país poderá ser apresentado em Portugal, onde apenas são permitidas as patentes de processos.

De facto o artigo 214.º do Código da Propriedade Industrial no seu n.º 3 diz que constitui acto lesivo para uma patente importar, vender, pôr em circulação ou ocultar de má fé produtos obtidos por qualquer dos referidos modos.

Ora parece-nos lógica a interpretação de que desconhecendo o importador o processo de preparação do produto químico e como não são permitidas em Portugal as patentes de medicamentos os laboratórios poderão apresentar qualquer medicamento preparado à base desse produto de processo patenteado.

O Dr. Pereira da Cruz diz nas anotações do Código que aquele que adquire um produto patenteado, que não é o caso, fabricado ilicitamente não incorre em responsabilidade se tal produto se destinar ao seu próprio uso. Se porém o puser à venda, ou em circulação, já fica sob a alçada das penalidades estabelecidas no artigo 214.º.

Quer dizer, há responsabilidades quando ao objecto da invenção é dado qualquer uso comercial.

Ora um laboratório ao dar uso a um produto transforma-o em medicamento que não está patenteado.

Como pode então estar sob a alçada das penalidades?

Isto é uma opinião que sabemos não ser perfilhada especialmente por algumas entidades interessadas.

Procurámos encontrar jurisprudência sobre este caso, mas nada vimos que nos pudesse esclarecer.

O artigo 9.º do Código da Propriedade Industrial estabelece que a patente pertence ao inventor ou à respectiva empresa desde que a invenção seja feita durante a execução do contrato de trabalho em que a actividade inventiva esteja prevista e seja especialmente retribuída.

O proprietário ou usufrutuário da patente e o possuidor de licença exclusiva de exploração podem conceder ou transferir a outrem licença para explorar total

ou parcialmente a invenção por determinado tempo, em certa zona ou em todo o território português, mediante condições de contrato que será celebrado por escritura.

Para terminar estas considerações sobre as patentes devemos informar que em Maio de 1959 se realizou em Roma um Convénio Internacional sobre Legislação Farmacêutica da Europa em que estiveram presentes delegados da França, Inglaterra, Suíça, Alemanha, Bélgica, Holanda e Luxemburgo, tendo chegado às seguintes conclusões aprovadas por unanimidade:

Constataram que existem grandes diferenças entre a legislação italiana vigente e a de outros países europeus com os quais a Itália tem estreitas relações de cultura e de intercâmbio científico-técnico e desejaram que se inicie a renovação da lei nacional farmacêutica italiana, chamando a especial atenção do Governo para os seguintes pontos:

- 1) Estimular, através de um eficiente serviço de inspecção técnica qualificada, a actualização e especialização das oficinas de produção, tendo em conta a necessidade de se integrarem no rápido progresso internacional.
- 2) Realizar, rapidamente, um apropriado sistema de tutela da propriedade intelectual que alinhe a Itália com a legislação vigente nos outros países do Mercado Comum Europeu o que constituiria um estímulo à pesquisa de novos fármacos originais e provocaria um frutífero intercâmbio com os outros países, permitindo ainda uma mais eficaz presença da Itália nas competições científico-técnico internacionais.
- 3) Assentar na prática do registo de novos fármacos na base de um exacto valor da documentação científica e terapêutica, realizando ao mesmo tempo um eficiente e constante serviço de *contrôle* dos produtos introduzidos no mercado.
- 4) Dar ao sector farmacêutico um novo aparelho legislativo que considere uma razoável e eficiente protecção das novidades terapêuticas por um lado e que, por outro, realize um potenciamento dos institutos de investigação e do *contrôle* dos fármacos.

Isto à luz da experiência internacional seria o único instrumento válido para limitar o indiscriminado aumento das especialidades farmacêuticas baseadas sobre a imitação de produtos originais e para moralizar, progressivamente, a produção e distribuição dos fármacos e para frenar a injustificada actividade especulativa, perante o doente, dos serviços de assistência pública e dos produtos mais qualificados, paralisando qualquer corajosa iniciativa para o desenvolvimento da pesquisa científica e piorando a qualidade da produção com prejuízo para a colectividade.

- 5) Controlar, severamente, a publicidade farmacêutica directa ao público a fim de evitar deformações da real fisionomia terapêutica dos produtos, em contraste com os modelos de ética e ciência que devem presidir à produção dos fármacos no interesse dos cidadãos.

Depreende-se, portanto, destas conclusões que os industriais italianos não estão satisfeitos com as liberdades da legislação actual.

G. Bergami, que dissertou nesse convénio internacional sobre a legislação italiana, focou, entre vários inconvenientes da legislação actual, a concorrência desmedida realizada por inúmeros fabricantes sem qualificação que, deste modo, além de prejudicarem a verdadeira indústria, contribuem para uma diminuição da qualidade dos produtos o que pode acarretar inconvenientes ao país num futuro próximo.

O legislador, ao querer evitar o monopólio e o agravamento económico, não reparou que a legislação actual, além de ter os inconvenientes já apontados, traz ainda o agravamento dos preços dos produtos pois as despesas de propaganda,

para apresentar vinte ou mais produtos idênticos são naturalmente muito maiores do que as realizadas para apresentar um ou dois e essas despesas têm de ser pagas pelo consumidor. Por este e outros motivos vai brevemente ser apresentado para discussão, em Itália, um novo projecto de lei relativo à patente de medicamentos.

MODELOS DE UTILIDADE E MODELOS E DESENHOS INDUSTRIAIS

No artigo 37.º do C. P. I. consideram-se como modelos de utilidade, susceptíveis de ser protegidos, os modelos de ferramentas, utensílios, vasilhame e demais objectos destinados a uso prático ou os de qualquer parte dos mesmos, que, por nova forma, disposição, ou novo mecanismo, aumentem ou melhorem as condições de aproveitamento de tais objectos.

O artigo 40.º considera modelos industriais os moldes, formas, padrões, relevos e demais objectos que sirvam de tipo na fabricação de um produto industrial, definindo-lhe a forma, as dimensões a estrutura ou a ornamentação.

Finalmente o artigo 41.º considera desenhos industriais as figuras, pinturas, fotografias, gravuras ou qualquer combinação de linhas ou cores aplicadas com o fim comercial à ornamentação de um produto por qualquer processo manual, mecânico ou químico.

Tanto os modelos como os desenhos são susceptíveis de ser protegidos, mas como só em casos particulares o farmacêutico poderá estar interessado no seu registo, abstemo-nos de fazer sobre eles quaisquer considerações, passando a dedicar a nossa atenção ao registo das chamadas marcas, que quanto a nós, tem bastante mais interesse no campo farmacêutico.

MARCAS

Uma marca significa uma palavra, sinal, desenho, etc., usado ou proposto para ser usado sobre ou em conexão com produtos comerciais ou industriais, para indicar que são produtos de marca registada.

Segundo o artigo 78.º do Código da Propriedade Industrial as marcas devem ser redigidas em língua portuguesa embora seja permitido o emprego de palavras latinas.

Apesar disso são bastante frequentes marcas nacionais registadas com PH, K e Y, bem como terminadas em p, t e d quando em português não existem nem aquelas letras nem estas terminações. Também o mesmo artigo refere que é possível o uso de palavras referentes à qualidade, modo de usar, cuidados para a sua conservação, etc., na língua ou línguas mais convenientes para o mercado a que o produto se destina desde que o corpo principal da marca seja redigido em português.

O disposto neste artigo não se aplica às marcas de registo internacional nem às marcas cujo registo for requerido por estrangeiros em Portugal, desde que apresentem certificados de registo do país de origem. Igualmente as destinadas a produtos para exportação podem ser redigidas em qualquer língua.

As marcas podem ser constituídas por um sinal ou conjunto de sinais nominais, figurativos ou emblemáticos que, aplicados por qualquer forma num produto ou no seu invólucro, o façam distinguir de outros idênticos ou semelhantes.

Não podem porém ser consideradas para registo as marcas exclusivamente compostas de sinais ou indicações que possam servir no comércio para designar a espécie, a qualidade, a quantidade, o destino, o valor, o lugar de origem dos produtos ou a época da produção ou que se tenham tornado usuais na linguagem corrente ou nos hábitos leais e constantes do comércio. As cores, por si só, não podem constituir marca, salvo se forem unidas e combinadas entre si ou com gráficos, dizeres impressos e outros elementos, por forma peculiar e distintiva.

Deste modo podemos considerar dois tipos de marcas ou sejam as nominativas e as figurativas ou emblemáticas sendo as primeiras constituídas por qualquer nome ou dizer e as segundas por desenhos ou figuras.

Será bom frisar que, nas marcas nominativas, se pode usar qualquer tipo de letra para as escrever, pois o registo do próprio tipo de letra, implicaria o pedido de registo de marca figurativa.

As marcas podem também ser mistas ou sejam constituídas simultaneamente por elementos nominativos e figurativos ou emblemáticos.

Uma das formas mais correntes de marcas é constituída pelas chamadas denominações de fantasia.

Há, por assim dizer, a maior liberdade para a constituição das marcas e, o que é fundamental para se conseguir o seu registo, é que ela possua a necessária eficácia distintiva.

Segundo a sentença de 16-6-948 publicada no Boletim da Propriedade Industrial de 1948, n.º 7, a pág. 432, podem ser usados como marcas para produtos farmacêuticos, nomes de fantasia, embora estes tenham uma desinência que corresponda ao nome de um determinado produto desde que este não seja usado em medicamentos.

Pela sentença de 26-2-945 publicada também no Bol. Prop. Ind., de 1945, no n.º 4 a pág. 171, não pode ser defeso nas especialidades farmacêuticas em que entre determinado específico designá-lo pelo seu nome só porque outrem o mencionara já em marca que fizera registar.

Normalmente a marca é aparente, isto é, encontra-se colocada de modo bem visível, mas a lei não proíbe que ela fique oculta sob a embalagem ou invólucro do objecto a que se refere, pois o Código diz apenas que a marca pode ser aplicada de qualquer forma.

Também não é necessário que a marca seja aderente, quer dizer, aposta no próprio produto, podendo constar dos seus invólucros, recipientes ou etiquetas.

No caso das especialidades farmacêuticas é imprescindível que ela fique na embalagem, pois a marca, a maior parte das vezes, representa neste caso o nome do medicamento especializado.

Durante a vigência do registo é permitido ao proprietário da marca adicionar a designação *marca registada* ou simplesmente as iniciais *M. R.*

É lícito o uso de marcas livres ou não registadas nos vários ramos de comércio mas em farmácia, segundo a Lei n.º 41 448, logo que seja concedida pela Direcção-Geral de Saúde autorização para se apresentar uma especialidade farmacêutica o interessado fica obrigado, sob pena de caducar a respectiva autorização, a pôr o medicamento no mercado e a requerer o registo da sua marca na Repartição da Propriedade Industrial no prazo de seis meses.

Depois de apresentado o pedido de registo da marca na Repartição da Propriedade Industrial será este publicado no Boletim da Propriedade Industrial para efeito de reclamação de quem se julgar prejudicado pela eventual concessão do registo.

O registo das marcas será feito em classes, estando incluídos os produtos farmacêuticos, veterinários e higiênicos na 5.ª classe. Nesta encontram-se também incluídos os produtos dietéticos, emplastos e material de penso, desinfectantes, etc.

É condição imposta no parágrafo 2.º do artigo 90.º do Código da Propriedade Industrial que cada pedido de registo não abranjerá mais do que cinco produtos e no caso de se pretender fazer o registo para mais produtos terão de se fazer tantos registos quantos os grupos de 5 que se pretendem abranjer.

Os cinco produtos têm no entanto de pertencer à mesma classe, pois se pertencerem a classes diferentes têm também de se requerer tantos registos quantas as classes.

O artigo 93.º especifica ainda nos números 10.º, 11.º e 12.º que constituem razão para recusa do registo que nele figurem falsas indicações sobre a natureza,

qualidades ou utilidade dos produtos a que a marca se destina, falsas indicações de proveniência e ainda reprodução ou imitação total ou parcial de marca anteriormente registada por outrem, que possa induzir a erro ou confusão no mercado.

Sobre semelhança de marcas encontram-se na jurisprudência os mais variados critérios e a par de registos de marcas bastante semelhantes que foram concedidas encontram-se recusas de marcas que nos parecem bastante distintas quer na escrita quer na pronúncia.

É um assunto que tem sido largamente debatido e que, apesar da muita jurisprudência publicada, ainda se não chegou ao estabelecimento de um critério único e satisfatório, pelo que é muito difícil prever a possibilidade de registo de determinada marca.

São muito frequentes as divergências de opinião entre os tribunais do Cível, Relação e Supremo.

O registo de uma marca é válido pelo prazo de 10 anos, podendo ser feita a revalidação por períodos sucessivos desde que seja efectuado o pedido nos prazos legais.

NOME E INSÍGNIA DE ESTABELECIMENTO

Os industriais e comerciantes domiciliados em qualquer lugar do território português têm o direito de adoptar um nome e uma insígnia para designar ou tornar conhecidos os seus estabelecimentos.

O nome do estabelecimento constitui a designação por que ele é conhecido ou referido.

Assim como a firma individualiza o comerciante e a marca, os produtos, o nome ou insígnia identificam o estabelecimento.

O nome e a insígnia têm de ser novos, isto é, distintos dos anteriormente registados. Tal como nas marcas também a lei não permite a reprodução ou imitação de nomes ou insígnias já registadas.

Cada estabelecimento apenas pode possuir um único nome e uma única insígnia. Se para um estabelecimento existir o registo de mais de um nome e de uma insígnia só valerá o primeiro registo regularmente feito.

Também como se referiu para as marcas, é possível o uso de nomes ou insígnias não registadas.

O artigo 142.º do Código da Propriedade Industrial diz que podem constituir nome do estabelecimento:

- 1) O pseudónimo ou alcunha do dono
- 2) Os nomes históricos.
- 3) As denominações de fantasia ou específicas
- 4) O nome da propriedade ou local do estabelecimento quando este seja acompanhado de um elemento distintivo.

O artigo 114.º diz que não podem fazer parte do nome ou insígnia do estabelecimento o nome individual, firma ou denominação social que não pertençam ao dono do estabelecimento, salvo provando a legitimidade do seu uso.

O direito do registo dura 30 anos, podendo também ser prorrogado por períodos iguais.

A patente, depósito ou registo será concedido àquele que primeiro apresente o pedido com os respectivos documentos em forma legal.

Os pedidos serão publicados no Boletim da Propriedade Industrial e haverá o prazo de 60 dias, a contar da sua publicação, para se apresentar reclamação, podendo haver réplica e tréplica sempre dentro de prazos idênticos.

Dos despachos pode ainda haver recurso para o tribunal da comarca de Lisboa e este deverá ser apresentado no prazo de 90 dias. Da sentença poderão ainda as partes apelar para a Relação e Supremo Tribunal de Justiça.

Poderíamos alongar a nossa exposição dizendo alguma coisa sobre os delitos contra a propriedade industrial, como porém se trata de um assunto que só especialmente poderá interessar e para não alongarmos estas nossas considerações, daremos por terminada esta exposição.

CONCLUSÃO

Após a exposição foram discutidos em pormenor vários problemas focados, dentre os quais mereceu especial atenção o referente ao registo das patentes dos processos de obtenção de produtos químicos, tendo-se concluído ser de toda a conveniência que seja revista a lei das patentes de modo a evitarem-se os abusos que se estão a verificar e que só podem redundar em prejuízo e trazer dificuldades à investigação e síntese química em Portugal.

BIBLIOGRAFIA

- Acórdão de 25 de Novembro de 1953*, Proc. 4 889 do Tribunal da Relação do Porto, Bol. Min. Just., 1954, 42, 120.
- Acórdão de 15 de Dezembro de 1959*, Proc. 57 923 do Supremo Tribunal de Justiça, Bol. Min. Just., 1960, 92, 432.
- BERGAMI, G.: *Legislazione Farmaceutica in Italia*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 337.
- BOLLA, P.: *Legislazione Farmaceutica Svizzera*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 449.
- CHAVATTE, F.: *Rapport sur la Legislation Pharmaceutique dans le Pays le Benelux*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 714.
- CORTE-REAL, R. M.: *Código da Propriedade Industrial*, 1963.
- COSTA PINHEIRO: *Legislação Portuguesa sobre Marcas*, 1920.
- CAUZ, J.: *Código da Propriedade Industrial*, 1953.
- SAMPAIO, L. S.: *Breves Apontamentos de Propriedade Industrial e de Algumas das Sujeições ao Direito Fiscal*, 1963.
- Decret n.º 60 507, du 30 Mai 1960*: *Portant Application de l'Article L. 603 du Code de la Santé Publique Instituant des Brevets Speciaux de Medicaments*, *An. Pharm. Fr.* (P. Prof.), 1960, 18, 85.
- DUCWORTH, A.: *Pharmaceutical Legislation in Great Britain*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 511.
- EISHOLD, K. W.: *La Legislazione Brevettistica per i Prodotti Farmaceutici in Germania*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1960, 15, 3.
- LAAR, J.: *La Legislazione Farmaceutica in Germania*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 581.
- MORICE, R.: *La Legislation Pharmaceutique en France*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1959, 14, 581.
- SAVIOTTI, G.: *Considerazioni sulla Brevettabilità nel Campo Farmaceutico in Italia*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1961, 16, 626.
- SAVIOTTI, G.: *Il Brevetto Speciale per Medicamenti in Francia: Considerazioni Dopo Circa due Anni Dalla Sua Creazione*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1962, 17, 233.
- SAVIOTTI, G.: *Valutazioni e Previsioni Estere Sulla Futura Legge Italiana Sui Brevetti Farmaceutici*, *Il Farmaco*, Ed. Pratica, 1962, 17, 416.

II SECÇÃO

PENICILINAS RECENTES. SUA ESTABILIDADE

L. NOGUEIRA PRISTA

Prof. Cat. da Fac. de Farmácia do Porto

Já se passaram 34 anos sobre o dia em que Fleming teve a ideia de designar por penicilina um caldo filtrado de cultura de *Penicillium*.

Foi preciso, contudo, que decorresse ainda mais de uma dezena de anos para que a esclarecida equipa de CHAIN, HEATLEY e FLOREY pudesse estabelecer condições óptimas de produção da penicilina e, principalmente, aclarar o mistério da sua química, bacteriologia e farmacologia.

Ainda hoje, a 20 anos do seu isolamento e determinação da sua estrutura, a penicilina é um dos mais importantes antibióticos utilizados na terapêutica, o que justifica as contínuas investigações a seu respeito.

Problemas, como o da sua produção em escala industrial, levantaram-se e têm continuado a surgir, bem como, hipóteses de síntese, cujo rendimento está ainda muito longe do desejado; pretensas modificações químicas, traduzíveis em diversidade de acção, têm sido realizadas com auxílio de substâncias de efeito precursor; etc.

No desejo de serem obtidos derivados diferentes das penicilinas clássicas, procuraram os investigadores conseguir compostos que originassem menos resistências microbianas e fossem menos alergisantes, mais activos e estáveis.

Na década de 47-58, conjugando-se os esforços dos químicos e farmacologistas, obtêm-se novas penicilinas, recorrendo ao emprego de precursores variados que os *Penicillium* incorporam na molécula do antibiótico, em certa altura da sua biossíntese. A fenoxipenicilina (penicilina V) e a alimercaptopenicilina (penicilina O) constituem exemplos flagrantes de novos antibióticos, o primeiro dos quais teve, e ainda tem, grande aceitação e largo consumo.

Ainda em 1957, SHEENHAM e HENERY-LOGAN (1), dedicando-se ao problema da preparação da penicilina V, cuja resistência aos ácidos suscitou o maior interesse, conseguem obtê-la por síntese parcial, através da combinação da d-penicilamina com o éster t-butilico do ácido ftalimidomalonaldeídico. Não correspondeu, porém, ao interesse teórico suscitado o rendimento prático da preparação, pelo que o método caiu no esquecimento e só em 1958, BATCHELOR e colaboradores (2), trabalhando nos laboratórios ingleses Beecham (Beecham Research Laboratories) lograram isolar um novo composto, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). O trabalho veio a lume em 1959, na revista *Nature* e pode dizer-se que as suas duas páginas revolucionaram mais o mundo, do que qualquer convulsão política ou social, num pequeno país efervescente de ideologia...

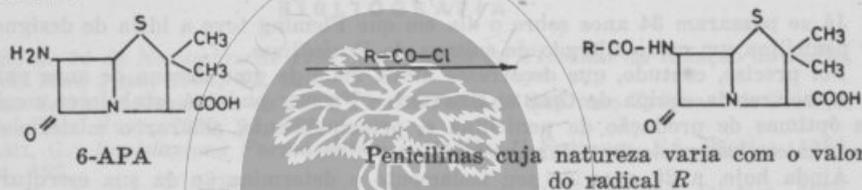
Como quase sempre, a grande descoberta surgiu de uma discrepância observada e interpretada correctamente — diferenças encontradas na titulação de p-aminobenzilpenicilina (3), (4), (5) por métodos químicos e biológicos, quando se omitia determinado precursor nos meios de cultura. Isola-se assim o ácido 6-aminopenicilânico, num caldo de fermentação de *Penicillium chrysogenum* W 5120, na ausência de precursores. A presença daquele composto foi evidenciada

pelo tratamento do líquido de fermentação com excesso de cloreto de fenil-acetilo, em presença de bicarbonato de sódio, depois de se haver extraído a penicilina G, a baixo valor de pH. O produto isolado, que apresentava Rf semelhante ao da penicilina G, reagia com cloreto de fenoxiacetilo, dando um antibiótico cujas características condiziam com as da penicilina V.

A determinação da estrutura do ácido 6-aminopenicilânico revelou que este composto constitui a amina base, da qual poderiam derivar todas as penicilinas. De então para cá, num trabalho metuculoso, que poderemos considerar de rotina na investigação, muitos novos compostos têm sido preparados, assistindo-se ao aparecimento de penicilinas várias com diferente espectro microbiano, e principalmente estabilidade diversa, em relação às penicilinas clássicas.

O mecanismo da sua preparação é fundamentalmente o mesmo, e que poderemos resumir na conjugação do ácido 6-aminopenicilânico com cloretos de ácido cujos acilos irão funcionar como radicais característicos da nova penicilina.

Esquemáticamente representaremos, como se segue, as transformações aludidas:



Por aqui se vê que as penicilinas são derivados lactâmicos do ácido dimetil-tiazolidino- β -carbónico, os quais podem apresentar diferentes radicais consoante o valor de R, variando deste modo as suas propriedades e comportamento. O ácido 6-APA constitui a parte fixa, imutável, de todas as penicilinas, compreendendo-se assim o seu extraordinário interesse na obtenção de novos antibióticos.

A primeira das novas penicilinas a ser preparada é muito semelhante à penicilina V e corresponde ao derivado α -fenoxipropiónico (α -fenoxietilpenicilina). Na origem recebeu a designação de BRL-152, cujas letras se referem aos laboratórios preparadores (Beecham Research Laboratories), tendo mais tarde sido designada, internacionalmente, por *phenethicillin* (6), (8).

O composto citado apresenta 2 isómeros, sendo a forma L cerca de 2 a 17 vezes mais activa, do ponto de vista de antibiose, do que a forma D.

Entre as suas principais propriedades salientamos a estabilidade em meio ácido e o facto de originar menos resistência do que a penicilina G ou V, embora com um espectro microbiano muito semelhante a elas.

De um estudo estatístico efectuado com estirpes de estafilococos verificou-se que, aproximadamente, 60 % dos fenómenos de resistência desapareciam em presença desta penicilina, acrescentando ainda a circunstância de se revelarem suficientes doses nitidamente mais baixas. De facto, com esta penicilina, que pode ser tomada oralmente, consegue-se uma actividade antibiótica directamente proporcional à dosagem, o que não é possível com a penicilina V (7), (8).

Na terapêutica emprega-se o seu sal de potássio, muito solúvel em água e resistente à hidrólise pelos ácidos. A sua decomposição, a pH 2 e pH 3, é da ordem da registada para a penicilina V, em idênticas circunstâncias (9). A sua máxima estabilidade consegue-se a pH 6,5, tamponando-a com uma mistura de fosfatos. Este facto permite o seu emprego não só em comprimidos ou cápsulas, mas ainda em solução oral extemporânea, já que em solução se mantém durante duas semanas a 4°, com uma perda de potência não superior a 1 % (10).

Em fins de 1960, os laboratórios Beecham sintetizaram uma nova penicilina, extremamente activa em relação aos estafilococos (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20). O novo produto, designado por BRL-1241 corresponde ao monohidrato

de penicilinato de sódio-6(dimetoxi-benzamido) ou mais simplesmente à 2,6-dimetoxifenilpenicilina (12), (11), (13).

Pó muito solúvel em água, as suas soluções perdem cerca de 50 % de potência quando mantidas a 23°, durante 5 dias, ou 20 % se a temperatura de conservação for de 5°.

O seu ponto de fusão é superior a 176° (com decomposição) e o poder rotatório específico $[\alpha]_D^{20} = +21,5^\circ$. O espectro de absorção das suas soluções aquosas, no ultra-violeta, apresenta um máximo de 280 $m\mu$ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}} = 54,0$ e um mínimo em 265,5 $m\mu$ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}} = 41,0$, o que permite distingui-la da penicilina G (máximo em 263 $m\mu$ e fraca absorção em 280 $m\mu$) e da fenoxietilpenicilina cujos máximo e mínimo se localizam em 268-9 $m\mu$ e 274 $m\mu$, respectivamente.

O composto é extremamente instável em meio ácido, decompondo-se ainda mais rapidamente do que a penicilina G. A pH 2 perde 50 % da actividade em 20 minutos (21). Se, porém, estiver tamponada com citrato de sódio, apresenta melhor conservação (22).

Aplicável apenas por via injectável, o interesse deste antibiótico reside na sua enorme actividade em relação às infecções estafilocócicas, pois é extraordinariamente resistente às penicilinases.

Em fins de Abril de 1961 foi dada a conhecer uma nova penicilina de síntese, a dl- α -fenoxipropilpenicilina. Trata-se de um α -fenoxibutiril derivado do ácido penicilânico, o qual foi sintetizado pelos laboratórios Pfizer e recebeu a designação abreviada de PA-248 ou *propicillin* (23).

Composto facilmente solúvel em água sob a forma de sal de potássio, apresenta ainda uma lipossolubilidade mais elevada do que a penicilina G ou V. É muito estável em meio neutro ou ácido, sendo a sua velocidade de decomposição a pH 3, bastante menor do que a observada com a penicilina V.

A sua máxima estabilidade consegue-se em meio neutro, desde que se tampone a solução com uma mistura de fosfatos ou, preferentemente, de citrato de sódio com ácido cítrico. Este facto, bem como a sua compatibilidade com diversos aromatizantes como a canela, e edulcorantes como a sacarina e o chocolate, permitiu o seu emprego em soluções pediátricas de preparação extemporânea.

Do ponto de vista farmacológico (24), (25), (27) aconselha-se nas infecções estafilocócicas e estreptocócicas, sendo grande parte do seu êxito devido à resistência apresentada em relação às penicilinases, destruindo-se a uma velocidade que é cerca de 40 % da observada com a penicilina V (25).

Em Junho de 1961 apareceu outro derivado de síntese do ácido 6-aminopenicilânico, o qual é conhecido por BRL-1341 ou *ampicillin*. Corresponde, quimicamente, ao ácido 6-[D(-)- α -aminofenilacetamido]-penicilânico ou α -aminobenzilpenicilina. É solúvel em água, dissolvendo-se a 20°, numa proporção de 2,8 %. O seu coeficiente de solubilidade aumenta sempre que o pH da solução se eleve ou abaixe e as soluções ácidas, a pH 5, são muito estáveis. A pH 2 e a 37° perde 5 % da sua actividade em cerca de duas horas. O composto, que se apresenta como um pó branco, funde a 202°, com decomposição. O poder rotatório do produto, hidratado com 5 % de água, é de $[\alpha]_D^{20} = +281,2^\circ$ (c=0,2-2 em água) (28), (31).

Dado que o isómero L é menos activo, utiliza-se, exclusivamente, na terapêutica o derivado D.

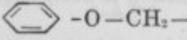
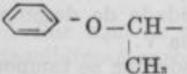
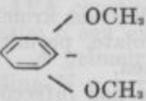
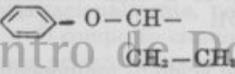
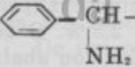
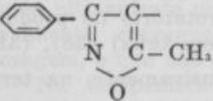
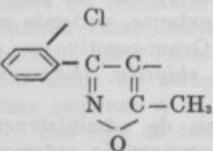
Ao contrário das penicilinas anteriores, não é estável em relação às penicilinases (29), (30), mas o seu espectro microbiano é muito extenso, podendo ser aplicado em infecções produzidas por micro-organismos de Gram-positivo ou de Gram-negativo, como estafilococos, salmonelas, proteus, *shigellæ*, *hæmophilus*, etc.

Em face do exposto, é empregado em fórmulas sólidas, de administração oral, já que é difícil de estabilizar em xaropes, mesmo de preparação extemporânea. Como o PA-248, não é destruído por edulcorantes, do tipo da sacarina.

A esta lista de derivados, cujo interesse acabámos de apontar, veio acrescentar-se uma série de compostos contendo radicais isoxazolilos e derivando também do ácido 6-aminopenicilânico. Assim, em 1961 (32), (33), DOYLE e colaboradores sintetizaram a primeira destas penicilinas, conhecida por BRL-1400 e que quimicamente corresponde ao 5-metil-3-fenil-4-isoxazolilpenicilina.

Notavelmente activa em relação às bactérias de Gram-positivo (34), (35), (36), (37), (38), (39) e altamente resistente aos ácidos e penicilinases (41), foi contudo, rapidamente destronada pelo seu derivado clorado, orto-substituído. Esta nova penicilina, com a designação de código de BRL-1621, corresponde ao sal sódico, monohidratado do 3-orto-clorofenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina. É um pó incolor, microcristalino, solúvel em água. O seu poder rotatório é de $[\alpha]_D^{20} = +162^\circ$ (c=1 % em água) (40), (34).

QUADRO I

Valor de R	Designação química	Designação corrente	Estabilidade	
			Ácidos	Penicilinases estafilocóicas
	Fenoximetilpenicilina	Penicilina V	Estável	Instável
	α -fenoxietilpenicilina	Phenethicillin ou BRL-152	Estável	Estável
	2,6-dimetoxifenilpenicilina	Methicillin ou BRL-1241	Instável	Muito estável
	α -fenoxipropilpenicilina	Propicillin ou PA-248 ou PA-284	Estável	Estável
	α -aminobenzilpenicilina	Ampicillin ou BRL-1341	Muito estável	Instável
	3-fenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina	Oxacillin ou BRL-1400	Estável	Muito estável
	3-orto-clorofenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina	BRL-1621	Estável	Muito estável

As suas soluções aquosas são estáveis em meio ácido, embora em menor grau do que as de BRL-1341. Quando conservadas a 5° (pH 6-7,5) não acusam perda de potência durante 7 dias. A vida média deste produto, em solução hidroalcoólica a 50 %, de pH 1,3, e a 35°, é de 160 minutos, valor aproximadamente igual ao registado com o BRL-1400 e com a penicilina V (33).

O seu espectro de absorção, na região do infra-vermelho (pastilha de BrK), revela absorção máxima (60-100 %) localizada em 5,66 μ , 6,01 μ , 6,24 μ , 6,62 μ , 7,09 μ , 7,47 μ e 12,99 μ e absorção mínima (0-30 %), circunscrita em 3,26 μ , 3,41 μ , 3,48 μ , 9,65 μ , 9,94 μ , 10,11 μ , 10,33 μ , 11,19 μ e 11,82 μ .

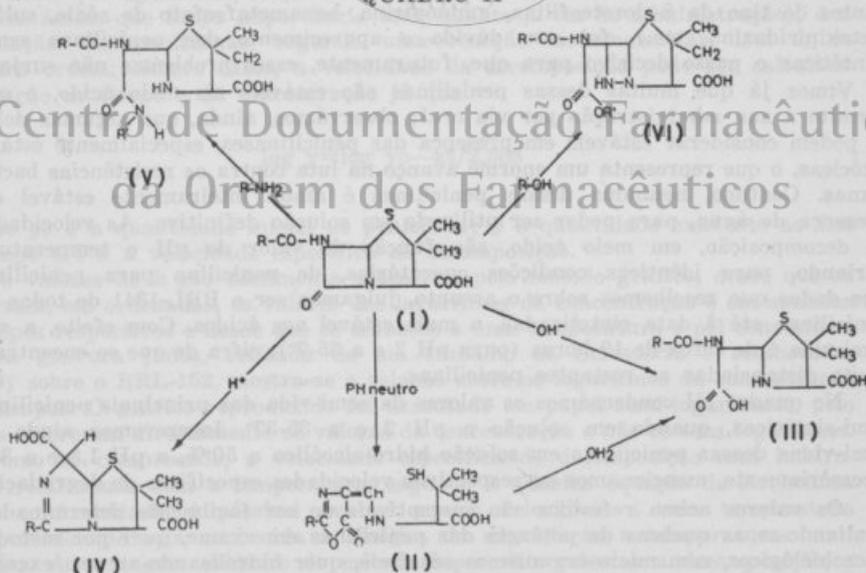
Indicamos, no quadro I, as fórmulas das principais penicilinas semi-sintéticas, considerando-as derivadas da estrutura-base, assinalada anteriormente. A propósito de cada uma, menciona-se o nome químico e a estabilidade em relação aos ácidos e penicilinas.

É quase proverbial a instabilidade das penicilinas, tomando esta observação particular acuidade, quando aplicada à penicilina G. A sua degradação, em meio alcalino (42), (43), em meio ácido (42), (43), em presença de metais pesados, de alcoóis (43), de redutores, de aminas (42), (43), etc., tem levado ao seu manuseio com especiais cuidados, preponderantemente, sempre que se encontre em veículos aquosos ou em presença de vestígios de humidade.

A maioria das degradações assinaladas para a penicilina G processa-se por hidrólises, geralmente favorecidas pelo calor. Assim, a baixo valor de pH, a penicilina origina ácido penílico, por isomerização, enquanto que em meio neutro ou alcalino se transforma em ácido penicilóico. Esta última transformação inactiva-a completamente e processa-se por abertura do anel β -lactâmico. A cinética da reacção de decomposição depende da concentração hidroxilónica, sempre que a penicilina se encontre solubilizada. Este tipo de decomposição é, aliás, o que se observa quando a penicilina é hidrolisada pelas penicilinasas, formando-se, dessa acção, como termo final, o ácido penicilóico.

A transformação em meio neutro processa-se levando à formação intermédia de ácido penicilénico, a qual corresponde à abertura do ciclo tiazolidínico do

QUADRO II



Principais degradações das penicilinas (I) e (II) — ácido penicilénico; (III) — ácido penicilóico; (IV) — ácido penílico; (V) — derivado aminado; (VI) — derivado alcoólico.

composto. Esta substância, apresentando vários sistemas insaturados, revela nítida absorção à luz ultra-violeta em 322 $m\mu$, facto que está de acordo com o aumento de absorção observado nessa zona, sempre que se aquece a penicilina a pH 7,5.

Como se vê, por acção das aminas, alcoóis e alcalinidade é sempre afectada a função cetónica do azeto. A alteração pelos alcoóis é extremamente semelhante à realizada por intermédio das bases alcalinas.

Como se compreende, a degradação da penicilina, em ambiente fechado e na ausência de humidade, é muito lenta, mas se a quantidade de água presente atingir os 4 %, o processo de decomposição desenvolve-se com grande rapidez, chegando a penicilina a perder 40-80 % da sua potência em seis meses, a 25°. Naturalmente que este facto se reveste da maior importância na obtenção de ampolas de penicilina para preparação extemporânea. Como bem se compreende, a destruição da penicilina em meio aquoso processa-se rapidamente, tendo sido propostos vários métodos a fim de retardar a aludida destruição. Todos os autores estão de acordo em que é conveniente tamponar as soluções do antibiótico, havendo, contudo, largas discrepâncias quanto à escolha do tamponante a empregar. Assim, HAHN observou que a estabilidade máxima era conseguida com tampão de citrato, enquanto que PRATT é mais favorável ao uso dos fosfatos. MACEK opina que a acção estabilizante depende apenas do poder tamponante e é independente dos iões e THOMAS propõe indiferentemente o uso de citrato, fosfato ou acetato de sódio como meio de estabilizar o pH (43).

Naturalmente que, como em casos análogos, se pode melhorar a estabilidade desde que se substitua parte do veículo aquoso por um líquido onde a decomposição seja mais lenta. É o que sucede com o sorbitol, tão utilizado na preparação de suspensões definitivas de penicilina-procaína. Estas fórmulas mantêm-se, geralmente, por um período de 12 meses sem alteração apreciável. Com efeito, tratando-se de suspensões, a reacção de decomposição é de zero ordem, sendo a velocidade de decomposição independente da concentração da substância decomposta.

Se bem que as tentativas feitas para estabilizar as penicilinas clássicas se tenham desenvolvido em larga escala e que possamos hoje contar com numerosos processos para retardar a sua degradação (como a junção de compostos complexantes do tipo da 8-cloroteofilina, aminopirina, hexametáfosfato de sódio, sulfameto xipiridazina, etc.), foi sem dúvida o aparecimento das penicilinas semi-sintéticas o passo decisivo para que, futuramente, esses problemas não surjam.

Vimos já que muitas dessas penicilinas são estáveis em meio ácido, o que permite a sua administração por via oral; observámos, ainda, que algumas delas se podem considerar estáveis em presença das penicilinases, especialmente estafilocócicas, o que representa um enorme avanço na luta contra as resistências bacterianas. Contudo, nenhuma dessas penicilinas é ainda inteiramente estável em presença de água, para poder ser utilizada em solução definitiva. As velocidades de decomposição, em meio ácido, são função do valor do pH e temperatura variando, para idênticas condições operatórias, de penicilina para penicilina. Dos dados que recolhemos sobre o assunto, julgamos ser o BRL-1341 de todas as penicilinas até à data sintetizadas, a mais estável aos ácidos. Com efeito, a sua semi-vida é de cerca de 19 horas (para pH 2 e a 35-7°), cifra de que se encontram muito distanciadas as restantes penicilinas.

No quadro III condensámos os valores da semi-vida das principais penicilinas semi-sintéticas, quando em solução a pH 2 e a 35-37°. Inscrevemos ainda as semi-vidas dessas penicilinas em solução hidro-alcoólica a 50 %, a pH 1,3 e a 35°. Acessoriamente, mencionamos as respectivas velocidades específicas de degradação.

Os valores acima referidos são susceptíveis de ser facilmente determinados, avaliando-se as quebras de potência das penicilinas em exame, quer por métodos microbiológicos, com micro-organismos sensíveis, quer hidrolisando-as com excesso de hidróxido de sódio 0,1 N e determinando a quantidade consumida, por titulação com ácido clorídrico 0,1 N, em presença de fenoltaleína.

QUADRO III

Penicilinas	pH 2 (água)		pH 1,3 (álcool de 50 %)	
	Semi-vida (horas)	K (h ⁻¹)	Semi-vida (horas)	K (h ⁻¹)
Penicilina V	2,2	0,31	2,66	0,26
BRL-152	2,7	0,256	—	—
BRL-1241	0,33	2,1	0,03	23,1
BRL-1341	19	0,036	11	0,062
PA-248	2,7 (aprox.)	0,256 (aprox.)	—	—
BRL-1400	—	—	2,66	0,26
BRL-1621	2,6	0,26	—	—

Preparam-se soluções a pH determinado, o que se consegue, para os valores mais baixos deste expoente, apenas com ácido clorídrico, e para os médios ou mais elevados, respectivamente, com tampões de citratos e fosfatos ou com soda. As experiências decorrem a temperatura controlada, habitualmente a 35-37°, como atrás observámos.

Tem-se notado, em todos os casos, que as decomposições de soluções de penicilinas, até pH 8, se processam seguindo a cinética das reacções de primeira ordem. Quando o pH é francamente alcalino, a velocidade de degradação é dependente da concentração de penicilina e de álcali presente, comportando-se como uma reacção bimolecular, de segunda ordem.

O caso que agora nos ocupa e mais interessa (por se referir à estabilidade em meio ácido, que tanta importância tem, quanto à via de administração), é a degradação das penicilinas, segundo uma reacção monomolecular, isto é, de primeira ordem. Nesses casos, a velocidade de decomposição pode ser calculada em função do tempo e da concentração já que

$$\log y = \log y_0 - kt/2,303$$

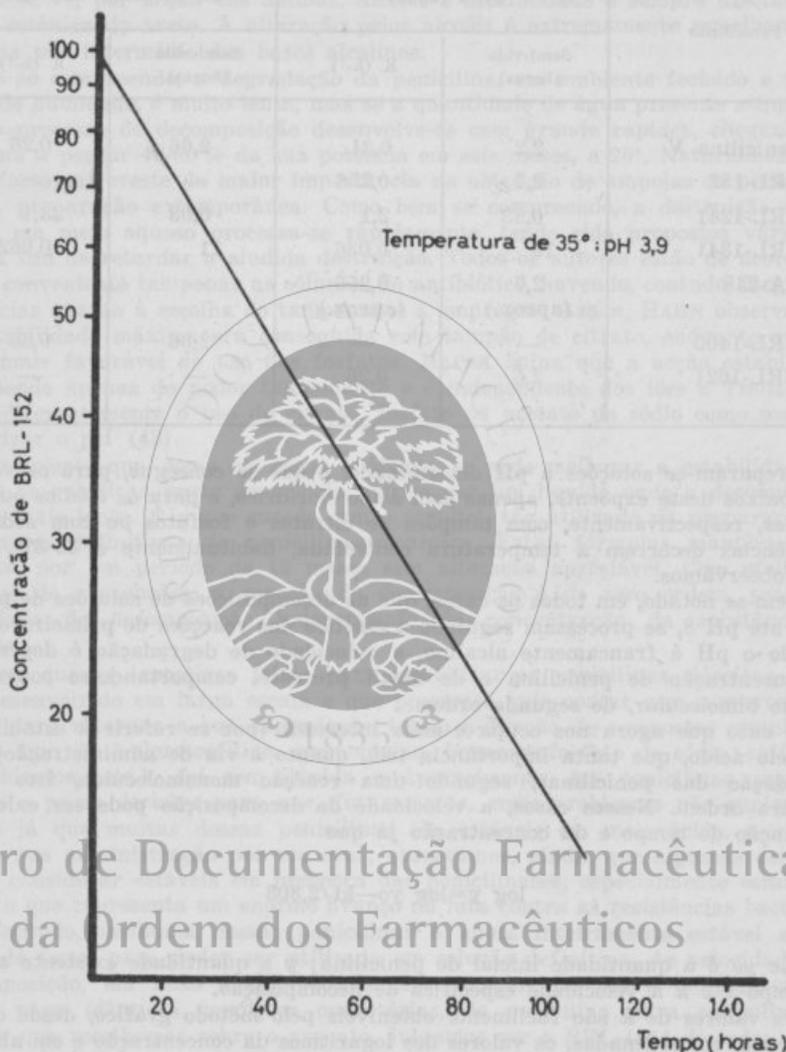
em que y_0 é a quantidade inicial de penicilina; y a quantidade existente ao fim do tempo t e k a velocidade específica de decomposição.

Os valores de k são facilmente obtíveis pelo método gráfico, desde que se inscrevam, em ordenadas, os valores dos logaritmos da concentração e em abscissas os tempos respectivos e desde que se trabalhe a uma temperatura e pH constantes.

Na gravura junta, retirada de um trabalho de SCHWARTZ e colaboradores (9) sobre o BRL-152, mostra-se a relação entre os logaritmos da concentração e os tempos. O gráfico reproduzido foi executado em papel semi-logarítmico, pelo que se inscrevem directamente os valores da concentração e não os seus logaritmos.

Como se compreende, a velocidade específica de decomposição está inteiramente relacionada com a temperatura, segundo a clássica equação de Arrhenius. Nesta conformidade, é possível avaliar aquela velocidade a uma temperatura baixa, desde que seja conhecida a cinética da degradação a temperaturas mais elevadas. A vantagem evidente do método é permitir calcular a decomposição, a longo prazo, à temperatura de armazenagem, tendo-se determinado a velocidade de decomposição a temperaturas mais elevadas e, portanto, num período de tempo

muito menor. Quere isto dizer que, por ensaios rapidamente realizados, se fica habilitado a prever a estabilidade do composto o que, pelos processos clássicos, só era possível ao fim de longos meses ou anos de conservação.



Como é sabido, a equação de Arrhenius, tão brilhantemente aplicada, na prática, ao cálculo da predição da estabilidade dos medicamentos, por Garrett, especifica que:

$$\log k = \log A - \frac{\Delta H_a}{2,303 R} \times \frac{1}{T}$$

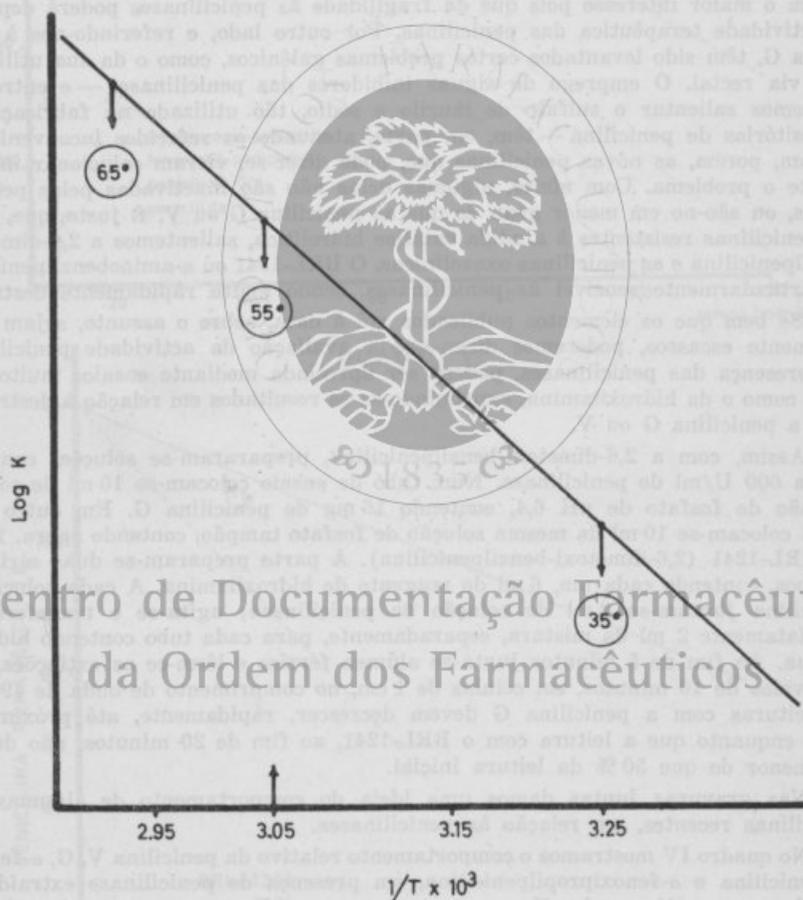
em que k é a velocidade específica de decomposição de um determinado princípio; A é uma constante, denominada factor de frequência; ΔH_a é o calor de activação, que oscila entre 10-30 Kcal.; R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta a que se desenrola a reacção de degradação.

Aplicando este cálculo às penicilinas e sabido que, geralmente, as suas soluções aquosas se alteram a pH menor do que 8, segundo reacções de primeira ordem, é fácil prever o seu período de estabilidade, em determinadas condições de pH.

Com efeito, conhecidas as velocidades específicas de decomposição a temperaturas elevadas, constrói-se um gráfico com $\log k$ e inversos das temperaturas absolutas; como $\log A$ e ΔH_a são constantes, deve obter-se, de acordo com a equação de Arrhenius, uma recta de coeficiente angular

$$-\frac{\Delta H_a}{2,303 R}$$

As curvas obtidas tomam o aspecto que reproduzimos. A figura representada foi retirada do citado trabalho de Schwartz, (9) com α -fenoxietilpenicilina.



Para a sua elaboração trabalhou-se a 35°, 55° e 65°, com soluções de penicilina a pH 6, tamponadas com fosfatos. As velocidades de decomposição registadas foram respectivamente:

$$k_{35^\circ} = 0,00635 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{55^\circ} = 0,0452 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{65^\circ} = 0,113 \text{ h}^{-1}$$

Com os três valores citados foi possível construir a curva apresentada, a partir da qual se pode determinar, por extrapolação, a velocidade de degradação a temperaturas mais baixas. Desta maneira verificamos, por exemplo, que a fenoxi-etilpenicilina se decompõe a 25° com $k_{25^\circ} = 0,00134 \text{ h}^{-1}$ e a 4°, que é a temperatura de conservação na geleira, com $k_{4^\circ} = 0,000129 \text{ h}^{-1}$. Estes dois valores revelam que o período de conservação a 4° é, sensivelmente, 10 vezes superior ao obtido quando a penicilina se encontra à temperatura ambiente.

A estabilidade às penicilinases é outro dos aspectos que interessa considerar, quando se estudam as novas penicilinas. É sabido que certos microorganismos, designadamente estafilococos e *Bacillus subtilis*, são capazes de hidrolizar a penicilina G, originando ácido penicilóico, segundo uma mecânica idêntica à processada na hidrólise alcalina. A reacção é conhecida por cinética de Michaelis-Menten e tem o maior interesse pois que da fragilidade às penicilinases poderá depender a actividade terapêutica das penicilinas. Por outro lado, e referindo-nos à penicilina G, têm sido levantados certos problemas galénicos, como o da sua utilização por via rectal. O emprego de alguns inibidores das penicilinases — e entre eles queremos salientar o sulfato de laurilo e sódio, tão utilizado na fabricação de supositórios de penicilina — têm, em parte, atenuado os referidos inconvenientes. Foram, porém, as novas penicilinas que, pode dizer-se, vieram solucionar inteiramente o problema. Com efeito, algumas delas não são inactivadas pelas penicilinases, ou são-no em menor grau do que as penicilina G ou V. É justo, que, entre as penicilinas resistentes à aludida catálise hidrolítica, salientemos a 2,6-dimetoxi-fenilpenicilina e as penicilinas oxazolónicas. O BRL-1341 ou α -aminobenzilpenicilina é particularmente sensível às penicilinases, sendo muito rapidamente destruído.

Se bem que os elementos publicados até à data, sobre o assunto, sejam relativamente escassos, poderemos dizer que a avaliação da actividade penicilínica, em presença das penicilinases, poderá ser apreciada mediante ensaios muito simples, como o da hidroxilamina, exprimindo-se os resultados em relação à destruição com a penicilina G ou V.

Assim, com a 2,6-dimetoxi-benzilpenicilina, prepararam-se soluções contendo 300 a 600 U/ml de penicilinase. Num tubo de ensaio colocam-se 10 ml de solução tampão de fosfato de pH 6,4, contendo 16 mg de penicilina G. Em outro tubo igual colocam-se 10 ml da mesma solução de fosfato tampão, contendo agora, 16 mg de BRL-1241 (2,6-dimetoxi-benzilpenicilina). À parte preparam-se duas séries de 5 tubos, contendo cada um, 6 ml de reagente de hidroxilamina. A cada solução de penicilina juntam-se 2 ml de solução de penicilinase; agita-se e transferem-se imediatamente 2 ml da mistura, separadamente, para cada tubo contendo hidroxilamina. Ao fim de 5 minutos junta-se alúmen férrico e lêem-se as extinções, com intervalos de 10 minutos, em células de 1 cm, no comprimento de onda de 490 m μ . As leituras com a penicilina G devem decrescer, rapidamente, até próximo de zero, enquanto que a leitura com o BRL-1241, ao fim de 20 minutos, não deverá ser menor do que 50 % da leitura inicial.

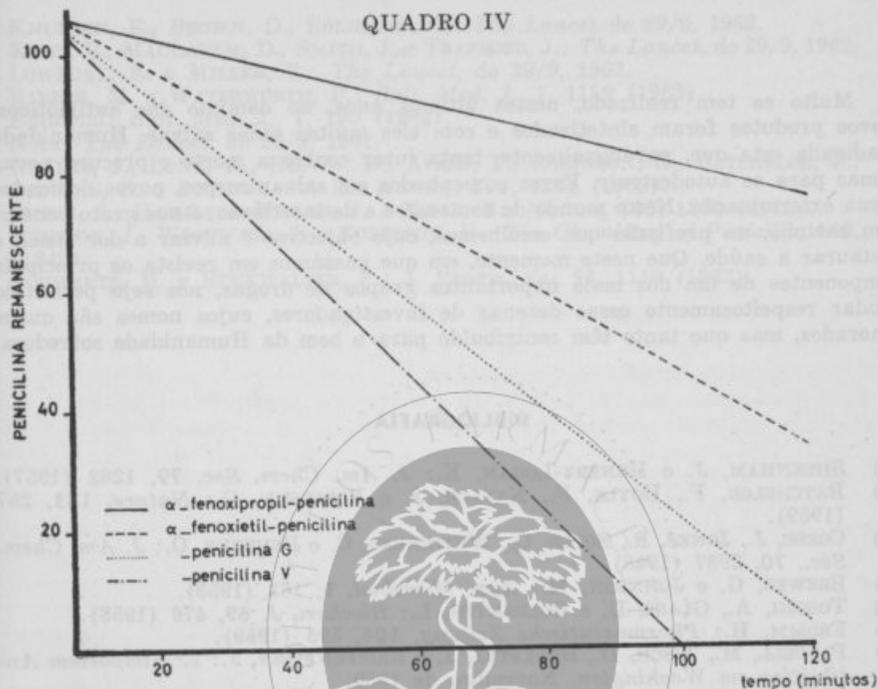
Nas gravuras juntas damos uma ideia do comportamento de algumas das penicilinas recentes, em relação às penicilinases.

No quadro IV mostramos o comportamento relativo da penicilina V, G, α -fenoxi-etilpenicilina e α -fenoxipropilpenicilina, em presença de penicilinase extraída do *Bacillus cereus*. No quadro V representamos um gráfico que mostra a inactivação comparada entre 2,6-dimetoxi-benzilpenicilina e BRL-1621. Nesta experiência, a penicilinase foi obtida a partir do estafilococo dourado.

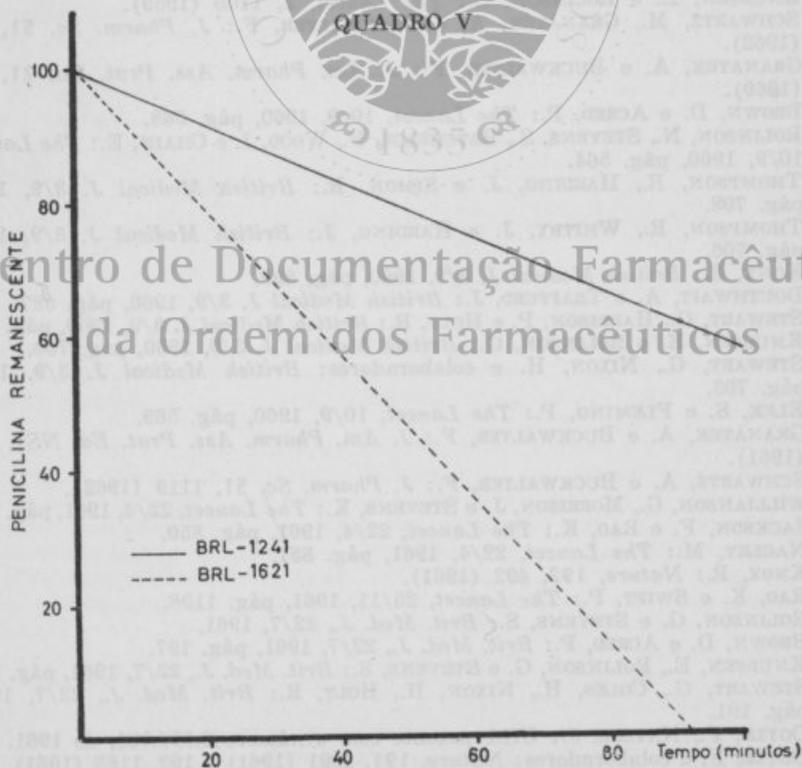
Da análise dos referidos quadros poderemos tirar a ilação de que a resistência das penicilinas às penicilinases se pode ordenar como se segue: penicilina V < penicilina G < BRL-152 < PA-248 < BRL-1621 < BRL-1241.

A resistência às penicilinases apresentada pelo BRL-1341 (α -aminobenzilpenicilina) é da ordem de grandeza da revelada pela penicilina V.

QUADRO IV



QUADRO V



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

Muito se tem realizado, nestes últimos anos, no domínio dos antibióticos. Novos produtos foram sintetizados e com eles muitas vidas salvas. Humanidade afadigada esta que, paradoxalmente, tenta lutar contra a morte e procura novas armas para se autodestruir. Povos empenhados em salvar corpos, povos dedicados à sua exterminação. Neste mundo de contrastes e de incertezas, é-nos grato pensar, com carinho, na profissão que escolhemos, cujo objectivo é aliviar a dor física e restaurar a saúde. Que neste momento, em que passámos em revista os principais componentes de um dos mais importantes grupos de drogas, nos seja permitido saudar respeitosamente essas dezenas de investigadores, cujos nomes são quase ignorados, mas que tanto têm contribuído para o bem da Humanidade sofredora.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SHEENHAM, J. e HENERY-LOGAN, K.: *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1262 (1957).
 (²) BATCHELOR, F., DOYLE, F., NAYLER, J. e ROLINSON, G.: *Nature*, **183**, 257 (1959).
 (³) CORSE, J., JONES, R., SOPER, Q., WHITEHEAD, C. e BEHRENS, O.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2937 (1948).
 (⁴) BREWER, G. e JOHNSON, M.: *App. Microbiol.* **1**, 163 (1953).
 (⁵) TOSONI, A., GLASS, D. e GOLDSMITH, L.: *Biochem. J.* **69**, 476 (1958).
 (⁶) FROMM, H.: *Pharmazeutische Zeitung*, **104**, 595 (1959).
 (⁷) PINDELL, M., TISCH, D., HOSKSTRA, J. e REIFFENSTEIN, J.: *7.º Simposium Antibiótico em Washington*, Novembro de 1959.
 (⁸) KNUDSEN, E. e ROLINSON, G.: *The Lancet*, **2**, 1105 (1959).
 (⁹) SCHWARTZ, M., GRANATEK, A. e BUCKWALTER, F.: *J. Pharm. Sc.* **51**, 523 (1962).
 (¹⁰) GRANATEK, A. e BUCKWALTER, F.: *J. Am. Pharm. Ass. Prat. Ed.* **21**, 490 (1960).
 (¹¹) BROWN, D. e ACRED, P.: *The Lancet*, 10/9, 1960, pág. 568.
 (¹²) ROLINSON, N., STEVENS, S., BATCHELOR, F., WOOD, J. e CHAIN, E.: *The Lancet*, 10/9, 1960, pág. 564.
 (¹³) THOMPSON, R., HARDING, J. e SIMON, R.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 708.
 (¹⁴) THOMPSON, R., WHITBY, J. e HARDING, J.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 706.
 (¹⁵) KNOX, R.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 690.
 (¹⁶) DOUTHWAIT, A. e TRAFFORD, J.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 687.
 (¹⁷) STEWART, G., HARRISON, P. e HOLT, R.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 694.
 (¹⁸) KNUDSEN, E. e ROLINSON, G.: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 700.
 (¹⁹) STEWART, G., NIXON, H. e colaboradores: *British Medical J.* **3/9**, 1960, pág. 703.
 (²⁰) ELEK, S. e FLEMING, P.: *The Lancet*, 10/9, 1960, pág. 569.
 (²¹) GRANATEK, A. e BUCKWALTER, F.: *J. Am. Pharm. Ass. Prat. Ed.* **NS1**, 560 (1961).
 (²²) SCHWARTZ, A. e BUCKWALTER, F.: *J. Pharm. Sc.* **51**, 1119 (1962).
 (²³) WILLIAMS, G., MORRISON, J. e STEVENS, K.: *The Lancet*, 22/4, 1961, pág. 847.
 (²⁴) JACKSON, F. e RAO, K.: *The Lancet*, 22/4, 1961, pág. 850.
 (²⁵) NAGLEY, M.: *The Lancet*, 22/4, 1961, pág. 851.
 (²⁶) KNOX, R.: *Nature*, **192**, 492 (1961).
 (²⁷) RAO, K. e SWIFT, P.: *The Lancet*, 25/11, 1961, pág. 1198.
 (²⁸) ROLINSON, G. e STEVENS, S.: *Brit. Med. J.*, **22/7**, 1961.
 (²⁹) BROWN, D. e ACRED, P.: *Brit. Med. J.*, **22/7**, 1961, pág. 197.
 (³⁰) KNUDSEN, E., ROLINSON, G. e STEVENS, S.: *Brit. Med. J.*, **22/7**, 1961, pág. 198.
 (³¹) STEWART, G., COLES, H., NIXON, H., HOLT, R.: *Brit. Med. J.*, **22/7**, 1961, pág. 191.
 (³²) DOYLE, F., NAYLER, J.: *USA patente com o número 2.996.501*, de 1961.
 (³³) DOYLE, F. e colaboradores: *Nature*, **191**, 1091 (1961) e **192**, 1183 (1961).

- (34) KNUDSEN, E., BROWN, D., ROLINSON, G.: *The Lancet* de 29/9, 1962.
 (35) KNOX, R., MACLAREM, D., SMITH, J. e TRAFFORD, J.: *The Lancet*, de 29/9, 1962.
 (36) LOWBURY, E. e MILLER, R.: *The Lancet*, de 29/9, 1962.
 (37) BARBER, M. e WATERWORTH, P.: *Brit. Med. J.*, 1, 1159 (1962).
 (38) Editorial: *Brit. Med. J.*, 1, 190 (1962).
 (39) Nota: *The Lancet*, de 29/9, 1962.
 (40) NAYLER, J., LONG, A., BROWN, D., ACRED, P., ROLINSON, G., BATCHELOR, F., STEVENS, S. e SUTHERLAND, R.: *Nature*, 195, 1264 (1962).
 (41) SMITH, J., HAMILTON-MILLER, J. e KNOX, R.: *Nature*, 195, 1300 (1962).
 (42) JOHNSON, J., WOODWARD, J. e ROBINSON, R.: *The Chemistry of Penicilin*, 440, (1949).
 (43) SCHWARTZ, M. e BUCKWALTER, F.: *J. Pharm. Sc.*, 51, 1119 (1962).



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

A. PINHO DE BRÓJO

1.º Assistente da Escola Superior
de Farmácia de Coimbra

A contínua evolução da terapêutica e a necessidade consequente de se dispor de medicamentos sempre mais activos e eficazes tornaram de importância vital o estudo dos medicamentos não apenas sob o aspecto do sabor, aroma e elegância formal, mas ainda, e principalmente, sob o ponto de vista da estabilidade, expressa tanto no plano qualitativo como no quantitativo.

O objectivo fundamental de tal estudo será o de garantir que todo e qualquer preparado medicinal, na dose e na forma utilizada, é seguramente inócuo para a saúde do consumidor e satisfaz, portanto, quer os requisitos legais de qualidade, pureza e actividade, quer algumas outras condições que a lei nem sempre considera: ausência de alterações, decomposições, interacções, etc.

É facto por demais conhecido que os fármacos e, consequentemente, as preparações farmacêuticas não se conservam indefinidamente, sofrendo, pelo contrário, alterações mais ou menos rápidas e mais ou menos profundas: as condições ambientais, os meios e técnicas de produção, a própria natureza das formas farmacêuticas adoptadas condicionam a sua estabilidade no espaço e no tempo. Se algumas das alterações se reflectem nos caracteres organolépticos — cor, odor, sabor e consistência — outras são pouco visíveis, ou mesmo invisíveis, embora afectando profundamente os princípios activos e conduzindo à perda parcial ou total das respectivas qualidades terapêuticas.

Os medicamentos estão sujeitos, efectivamente, à influência de três importantes grupos de factores — físicos, químicos e biológicos — cujos efeitos se exercem tanto sobre os fármacos puros como nas preparações galénicas de composição mais ou menos complexa. O calor e a luz — agentes físicos — o oxigénio, o anidrido carbónico, a humidade e o material de acondicionamento — agentes químicos extrínsecos — e as substâncias associadas, como solventes, intermédios, correctivos e conservadores — agentes químicos intrínsecos — determinam ou favorecem, com o tempo, modificações químicas diversas, como hidrólises, isomerizações, polimerizações, oxidações, precipitações, etc. Agentes biológicos vários, como insectos, algas, fungos e bactérias, provocam, também, importantes alterações, em regra de natureza enzimática.

A conservação dos medicamentos constitui, pois, uma das tarefas mais importantes que se deparam ao farmacêutico, muito particularmente quando maneja grandes quantidades de matérias-primas e é obrigado a manter em *stock* grandes quantidades de produtos já manipulados, tal como sucede na Farmácia Hospitalar e na Indústria Farmacêutica. É, sobretudo, a armazenagem prolongada das matérias-primas e dos produtos acabados que transmite maior acuidade ao problema da conservação dos medicamentos; e, neste aspecto, é o farmacêutico industrial o que mais criteriosamente se tem de preocupar com a eliminação das causas de transformação dos medicamentos.

A preparação de uma nova especialidade farmacêutica e a sua introdução no mercado implicam, necessariamente, o estudo dos factores susceptíveis de modificar qualitativa e quantitativamente a respectiva composição, bem como o conveniente ajustamento da fórmula e processo de fabrico, de forma a garantir-se uma estabi-

lidade aceitável durante todo o tempo que medeia entre a produção e o consumo. Mas não é apenas com os novos produtos que se impõe a apreciação da estabilidade; com efeito, exceptuando os casos em que os processos de fabrico estão rigorosamente padronizados, dever-se-á, sempre, proceder a estudos de conservação antes que novo lote do mesmo preparado seja introduzido no mercado. Na verdade, modificações aparentemente insignificantes nos intermédios, solventes, correctivos, materiais de acondicionamento e técnicas de preparação podem alterar significativamente a estabilidade do produto laborado. Os serviços de *controlo* de qualquer indústria farmacêutica deverão estar em condições de pôr em prática estudos de estabilidade, sempre que um novo produto ou um novo lote seja lançado no mercado. Os métodos de análise físico-química a utilizar nesses ensaios deverão ser suficientemente sensíveis e precisos para distinguir a droga inalterada dos produtos de degradação.

Se é certo que a apreciação criteriosa da estabilidade de qualquer medicamento representa consumo de dinheiro e de tempo, ela é, contudo, menos onerosa e prejudicial que a necessidade de se retirar do mercado um produto que não se mostrou suficientemente estável.

Até há bem poucos anos, o problema mais grave do estudo da conservação dos medicamentos estava no tempo exigido para a sua efectivação, o qual, por ser demasiado longo, poderia comprometer, seriamente, o interesse científico e profissional das especialidades e mesmo impedir a sua introdução no mercado. A lentidão dos ensaios clássicos de conservação, à temperatura ambiente, era nitidamente incompatível com as exigências da moderna indústria farmacêutica, em que a rapidez e segurança técnica constituem factores preponderantes para o bom êxito do lançamento de novas especialidades.

A possibilidade de aceleração dos ensaios de estabilidade, graças aos estudos de GARRETT, veio, entretanto, resolver praticamente o problema, permitindo o cálculo rápido das condições de conservação, a longo prazo, de um grande número de medicamentos. Os estudos de GARRETT envolvem a aplicação da equação de ARRHENIUS, que define a influência da temperatura sobre a velocidade das reacções químicas, em combinação com as leis clássicas da cinética química.

Assim, a determinação experimental da velocidade de decomposição dos medicamentos a temperaturas superiores à ordinária permite calcular fácil e rapidamente o grau de alteração que ocorrerá nas condições normais de armazenagem.

Antes de estudarmos a equação de ARRHENIUS, faremos uma breve revisão de algumas noções fundamentais de cinética química.

da Ordem dos Farmacêuticos

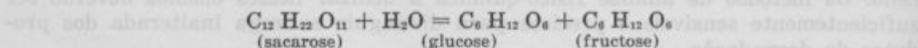
As reacções químicas podem classificar-se quer em função do número de moléculas intervenientes, ou, por outras palavras, em termos de *molecularidade*, quer pelo número total das moléculas cujas concentrações condicionam a cinética do processo, ou, o que é o mesmo, em termos de *ordem*. Mais precisamente, designa-se por *ordem* de uma dada reacção o somatório dos expoentes que afectam os termos de concentração dos reagentes na equação que exprime a respectiva cinética. Consideremos, com efeito, a conhecida reacção entre o iodo e o hidrogénio, gasosos



que envolve a combinação de 1 molécula de cada um dos elementos, para formar 2 moléculas de ácido iodídrico. Trata-se, portanto, de uma reacção *bimolecular*, cuja velocidade é expressa pela conhecida equação:

$$V = k [I_2] [H_2] \quad (1)$$

em que k representa a *velocidade específica de reacção*, ou, mais simplesmente, *constante de velocidade*. Sendo igual a 2 o somatório dos expoentes que afectam as concentrações de I_2 e H_2 , estaremos, como é evidente, perante um processo de *segunda ordem*. Regra geral, verifica-se uma exacta correspondência entre a *ordem* e a *molecularidade* das reacções químicas, podendo-se classificar, normalmente, de *primeira ordem* os processos em que apenas 1 molécula é decomposta e de *terceira ordem* os que englobam 3 moléculas reagentes. Casos há, porém, em que sendo 2 as moléculas reagentes, a velocidade de reacção depende apenas da concentração de uma delas, mantendo-se a outra praticamente invariável durante todo o processo. Consideremos a inversão da sacarose:



Em princípio, a velocidade de hidrólise seria:

$$V = K [C_{12}H_{22}O_{11}] [H_2O] \quad (2)$$

No entanto, sendo a água o solvente e encontrando-se em grande excesso relativamente à sacarose, a sua concentração manter-se-á praticamente constante e poderá ser incluída na constante K da expressão anterior, que se escreverá desta outra forma:

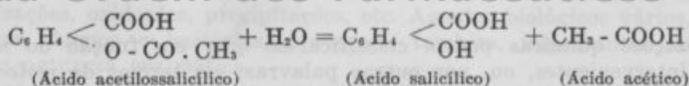
$$V = K [C_{12}H_{22}O_{11}] \quad (3)$$

Vê-se, assim, que a velocidade do processo de inversão depende exclusivamente da concentração da sacarose, muito embora se trate de uma reacção bimolecular. Os processos deste tipo são classificados de *pseudo-primeira ordem*.

Facto análogo se observa em algumas reacções trimoleculares, cuja velocidade depende exclusivamente da concentração de 2 dos reagentes, como se tratasse de processos de *segunda ordem*. Classificam-se estas reacções, como é óbvio, de *pseudo-segunda ordem*.

A par destes processos outros existem, em que a velocidade é condicionada por diversos factores que não incluem a concentração. É o que se observa nas reacções foto-químicas, envolvendo a absorção de luz e nos processos de adsorção em superfície. É o que sucede ainda nas decomposições ocorridas em suspensões aquosas, em que a concentração da substância activa dissolvida se mantém invariável, por se tratar de uma solução permanentemente saturada. Para sermos mais explícitos, consideremos uma suspensão de ácido acetilossalicílico, tamponada a determinado valor de pH , ácido.

A parte dissolvida da droga estará sujeita ao seguinte processo de hidrólise:



Tratar-se-ia, em princípio, e por motivos óbvios, de uma reacção de *pseudo-primeira ordem*, cuja velocidade dependeria da concentração de ácido acetilossalicílico em solução:

$$V = K [C_6H_4 \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{O} - \text{CO} \cdot \text{CH}_3 \end{matrix}] \quad (4)$$

Acontece, porém, que tal concentração possui um valor constante visto tratar-se, efectivamente, de uma solução *permanentemente* saturada, com um excesso de ácido acetilossalicílico em suspensão. Deste modo, poder-se-á incluir a dita concentração na constante K da equação anterior que se escreverá desta outra forma

$$V = K \quad (5)$$

que mostra, claramente, ser a velocidade de hidrólise, naquelas condições, independente da concentração total de ácido acetilossalicílico na suspensão aquosa.

Além das reacções de *ordem zero* e de *primeira* e *segunda ordem*, poderíamos citar exemplos de *terceira ordem* e, mesmo, de *ordem fraccionada*. O seu estudo, porém, não oferece aqui grande interesse, visto tratar-se de processos cuja ocorrência só raramente se verifica. O que importa, sim, acentuar é o facto de certas substâncias poderem decompor-se segundo reacções de *ordem zero*, *primeira* ou ainda *segunda ordem*, conforme as condições do meio em que a decomposição decorre. É este precisamente o caso do ácido acetilossalicílico, que na forma de solução tamponada se hidrolisará segundo uma reacção de *primeira* ou de *segunda ordem*, consoante o pH do meio é neutro ou alcalino, respectivamente. A decomposição poderá, ainda, ocorrer segundo um processo de *ordem zero*, desde que a quantidade de ácido acetilossalicílico ultrapasse o seu coeficiente de solubilidade e origine, assim, uma solução *permanentemente saturada*, com um excesso de substância em suspensão.

Na maioria das circunstâncias torna-se impossível prever, teoricamente, a *ordem* do processo de decomposição que um dado produto sofre, dada a existência de várias etapas intermediárias ou reacções elementares, cada uma delas possuindo a sua própria *ordem*. Esta representa, de facto, uma grandeza essencialmente empírica, cuja determinação exige medidas experimentais da velocidade de reacção em função do tempo de decomposição e de concentração final do produto. Para estarmos em condições de determinar a *ordem* dos processos de decomposição dos medicamentos, torna-se, pois, indispensável estudar as expressões matemáticas que, para cada tipo de reacção, definem as relações existentes entre as concentrações e os tempos de decomposição. Trataremos, assim, separadamente, das reacções de *ordem zero*, *primeira* e *segunda ordem*.

A — Reacções de *ordem zero*

Consideremos, novamente, o caso de uma suspensão de ácido acetilossalicílico e admitamos que o seu pH se mantém constante, num meio ambiente em que a temperatura é igualmente invariável. Designando por C_0 a concentração de ácido acetilossalicílico no momento da preparação ($t=0$) e por C_t a concentração existente após o tempo t , a velocidade (V) de decomposição hidrolítica da droga será dada pela conhecida equação (*):

$$V = -\frac{dC}{dt}$$

Tratando-se de uma reacção de *ordem zero*, V será constante (K) e independente de C (Vide equação 5); a expressão (6) poderá então escrever-se desta outra forma:

$$-\frac{dC}{dt} = K \quad (7)$$

Integrando esta equação entre os valores de C_0 ($t=0$) e C_t (Tempo = t), teremos, sucessivamente:

$$\int_{C_0}^{C_t} dC = -K \int_0^t dt \quad (8)$$

$$C_t - C_0 = -Kt \quad (9)$$

$$C_t = C_0 - Kt \quad (10)$$

(*) A velocidade de hidrólise será expressa, como é óbvio, em valores negativos (gramas ou moles/litro/unidade de tempo), uma vez que decresce com o tempo.

expressão esta que aplicada a reacções de *ordem zero* permite determinar, mediante conhecimento de K , a concentração da droga que existe na preparação ao cabo do tempo t .

Voltando ao exemplo concreto da suspensão do ácido acetilossalicílico e atendendo à já referida equação (4), vê-se que K é dado pelo produto da velocidade específica da reacção de *primeira ordem* pela concentração de droga existente numa solução saturada. Sabendo que essa velocidade específica é de $0,0488 \text{ dias}^{-1}$ e que a solubilidade do ácido acetilossalicílico, à temperatura de 25°C e a $\text{pH } 2,5$, é de $3,68 \text{ g/l}$, é evidente que

$$K = 0,0488 \times 3,68 = 0,18 \text{ g/l/dia } (25^\circ \text{C}; \text{pH } 2,5)$$

Supondo que a suspensão contém 70 g/l de ácido acetilossalicílico, fácil será saber, pela equação (10), qual a quantidade de produto não hidrolisado existente na suspensão ao cabo, por exemplo, de 14 dias, naquelas condições de temperatura e pH :

$$C_t = 70 - 0,18 \times 14 = 67,48 \text{ g/l}$$

Através da mesma equação e mediante conhecimento de K , torna-se possível, também, determinar o tempo em que a hidrólise do ácido acetilossalicílico atinge o máximo convencional de 10% ($C_t = \frac{9}{10} C_o$). Esse tempo, que se designa, correntemente, por *tempo de estabilidade* (t_E), será para a referida suspensão de ácido acetilossalicílico:

$$t_E = \frac{C_o - \frac{9}{10} C_o}{10 K} = \frac{70 - 63}{10 \times 0,18} = 38,88 \text{ dias}$$

Do mesmo modo se poderá calcular o tempo necessário para que a concentração da droga fique reduzida a 50% do valor inicial ($C_t = \frac{C_o}{2}$). Designa-se esse tempo, vulgarmente, por *vida média* ou *tempo de semi-vida*, o qual para o exemplo considerado terá o valor:

$$t_{1/2} = \frac{C_o - \frac{C_o}{2}}{2 K} = \frac{70 - 35}{2 \times 0,18} = 194,44 \text{ dias}$$

O conhecimento da constante K , indispensável em qualquer dos problemas apresentados, poderá obter-se, facilmente, através da mesma equação (10), determinando, experimentalmente, para cada processo de decomposição, a quantidade de droga remanescente (C_t) ao cabo de um dado tempo t . Teremos, então:

$$K = \frac{C_o - C_t}{t}, \quad (11)$$

em que C_o , C_t e t constituem grandezas conhecidas.

Poder-se-ia, também, recorrer ao método gráfico, coordenando, em abcissas e ordenadas, respectivamente, os valores de concentração com os tempos em que as determinações foram efectuadas. Tratando-se de um processo de *ordem zero*, a linha obtida será necessariamente uma recta descendente, que intersecta o eixo das abcissas no ponto correspondente à concentração inicial do medicamento ($t = 0$), e cuja *inclinação* terá, precisamente, o valor de $-K$. Este processo é, sem dúvida, mais trabalhoso que o precedente, mas tem a vantagem de, concomitantemente, se poder verificar se a degradação em causa é ou não de *ordem zero*.

B — Reacções de primeira ordem

Consideremos, agora, o caso de uma solução de ácido acetilossalicílico, tamporada a pH = 2,5 e mantida à temperatura constante de 25° C. Designando C_0 a concentração de droga no momento da preparação ($t = 0$) e por C_t a concentração de produto não decomposto ao cabo de tempo t , a velocidade (V) de hidrólise será dado pela já referida equação (6):

$$V = - \frac{dC}{dt}$$

Tratando-se de um processo de primeira ordem, a velocidade V será directamente proporcional à concentração de ácido acetilossalicílico dissolvido (C), de acordo com a já conhecida expressão (4):

$$V = K C$$

em que K representa a velocidade específica de primeira ordem.

Introduzindo $K C$ na equação (6), em substituição de V , teremos:

$$-\frac{dC}{dt} = K \cdot C \quad (12)$$

Integrando esta expressão entre os valores de C_0 ($t = 0$) e C_t (tempo = t), poderemos escrever, sucessivamente:

$$\int_{C_0}^{C_t} \frac{dC}{C} = -K \int_0^t dt \quad (13)$$

$$\ln C_t - \ln C_0 = K (t - 0) \quad (13)$$

ou

$$\ln C_t = \ln C_0 - K t \quad (14)$$

Convertendo os logarítmos naturais em logarítmos decimais, teremos:

$$\log C_t = \log C_0 - \frac{K t}{2,303} \quad (15) \quad \text{ou} \quad \log \frac{C_t}{C_0} = - \frac{K t}{2,303} \quad (16)$$

equação esta que aplicada a reacções de primeira ordem permite calcular, mediante conhecimento de K , a concentração de droga íntegra existente na solução após o tempo t .

Assim, voltemos ao exemplo concreto da solução de ácido acetilossalicílico e admitamos que ela se encontra saturada no momento da preparação ($t = 0$). Fácil será determinar a quantidade de produto não hidrolisado ao cabo, por exemplo, de 14 dias, sabendo que:

$$\begin{aligned} C_0 &= 3,68 \text{ g/l} \\ k &= 0,0488 \text{ dias}^{-1} \\ t &= 14 \text{ dias} \end{aligned}$$

De acordo com a equação (16), teremos então:

$$\log \frac{C_t}{C_0} = - \frac{0,0488 \times 14}{2,303}$$

$$\log C_t = - 0,295 + \log 3,68 = 0,26924$$

$$C_t = 1,85 \text{ g/l}$$

O conhecimento da constante K , indispensável para a resolução dos problemas deste tipo, poderá obter-se, facilmente, através da equação (16), determinando, experimentalmente, para cada processo de alteração, a quantidade de droga remanescente após determinado tempo de armazenagem a temperatura constante; aplicar-se-á a expressão:

$$K = \log \frac{C_0}{C_t} \cdot \frac{2,303}{t} \quad (17)$$

em que C_0 , C_t e t constituem grandezas conhecidas.

Poder-se-á, também, utilizar o método gráfico, coordenando em abcissas e ordenadas, respectivamente, os valores de $\log C_t$ com os tempos em que as determinações de C_t foram efectuadas. A linha obtida será, necessariamente, uma recta descendente que intersecta o eixo das abcissas no ponto correspondente a $\log C_0$ ($t = 0$), e cuja inclinação terá o valor de $-K/2,303$, a partir do qual se calculará, facilmente, a velocidade específica da reacção de primeira ordem (K). O método gráfico é, sem dúvida, mais laborioso que o precedente, mas oferece a vantagem de, paralelamente, se poder confirmar se a alteração em causa é de primeira ordem.

A expressão gráfica da variação das concentrações com o tempo poderá ser obtida não com os valores de $\log C_t$, mas antes com os de $\log \frac{C_t}{C_0}$, facilitando-se, neste caso, o cálculo de K mediante recurso a já conhecida noção de vida média ($t_{1/2}$). Sendo $t_{1/2}$ o tempo necessário para que C_0 se reduza a $\frac{C_0}{2}$ ($C_t = \frac{C_0}{2}$), fácil será deduzir da equação (16) a relação existente entre K e a vida média:

$$\log \frac{C_0}{2 C_0} = \frac{K t_{1/2}}{2,303}$$

$$\log \frac{C_0}{C_0} = \frac{K t_{1/2}}{2,303}$$

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

Traçada, pois, a curva de variação de $\log \frac{C_t}{C_0}$ com o tempo, facilmente se

determinará o valor de t para o qual $\log \frac{C_t}{C_0}$ é igual a $\log \frac{1}{2}$. Introduzindo esse valor de t ($t = t_{1/2}$) na equação (18), rapidamente se obterá a velocidade específica de primeira ordem (K).

Contrariamente ao que sucede nos processos de ordem zero, a vida média é, neste caso, independente da concentração da droga sujeita à alteração:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (19)$$

Assim, qualquer que seja o processo de primeira ordem e seja qual for a concentração da droga no tempo 0, é evidente que após um tempo de armazena-

gem igual a uma *vida média* essa concentração estará reduzida a 50 % do valor inicial (C_0). Atribuindo a C_0 o valor de 100, a concentração C_t ao cabo de 1, 2 e 3 *vidas médias* será, respectivamente, 50, 25 e 12,5. Poderemos, então, escrever:

$$\frac{C_0}{C_t} = 2^n \quad (20)$$

ou

$$\frac{C_t}{C_0} = \left(\frac{1}{2}\right)^n \quad (21)$$

em que n representa o número de *vidas médias* contido no tempo de armazenagem (t), isto é:

$$n = \frac{t}{t_{1/2}} \quad (22)$$

Vê-se, assim, como é fácil determinar, para cada processo de decomposição de primeira ordem, a concentração remanescente (C_t) após determinado tempo de armazenagem (t): bastará, para isso, conhecer a *vida média* da droga em causa e calcular o valor de n pela equação (22). Facilita-se este cálculo, notavelmente, se dispusermos de uma tabela que indique para diversos valores de n o quociente

$\frac{C_t}{C_0}$ da expressão (21). A tabela I indica os valores de $\frac{C_t}{C_0}$ para n compreendido entre 0,1 e 4.

Consideremos, novamente, o caso de uma solução de ácido acetilossalicílico, tamponada a $pH = 2,5$ e mantida à temperatura constante de $25^\circ C$. Conhecida a velocidade específica (K) do processo de hidrólise do ácido acetilossalicílico nestas condições ($K = 0,0488$ dias $^{-1}$), fácil será calcular a sua *vida média* (Equação (19)):

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{0,0488} = 14,2 \text{ dias}$$

Se quisermos saber qual a concentração remanescente após 30 dias de armazenagem, bastará calcular o número de *vidas médias* (n) contidos nesses 30 dias, o qual será, de acordo com a equação (22):

$$n = \frac{30}{14,2} = 2,1$$

Consultando a tabela I vê-se que, para $n = 2,1$, $\frac{C_t}{C_0}$ terá o valor de 0,23.

Conclui-se, pois, que ao cabo de 30 dias a concentração de ácido acetilossalicílico estará reduzida a 23 % do valor inicial.

A tabela I oferece ainda a vantagem de poder ser utilizada no cálculo de $t_{1/2}$ e K , a partir do conhecimento da quebra de concentração que uma dada droga sofre num determinado tempo de armazenagem. Esta vantagem da tabela torna-se tanto mais evidente quanto é certo encontrarem-se, frequentemente, na literatura da especialidade, referências ao grau de decomposição das principais drogas para um ou vários períodos de conservação. Quando se afirma, por exemplo, que a concentração de um dado produto diminui de 20 % após 32 dias de armazenagem

a 25° , é evidente que para esse valor de t o quociente $\frac{C_t}{C_0}$ será igual a 0,8.

Localizando este valor na coluna de $(\frac{1}{2})^n$ da tabela I, encontra-se, imediatamente, para n o valor aproximado de 0,32. Conclui-se, pois, que o tempo de armazenagem

TABELA I — Valores de $(\frac{1}{2})^n$

n	$(\frac{1}{2})^n$	n	$(\frac{1}{2})^n$	n	$(\frac{1}{2})^n$
0,10	0,9331	0,64	0,6418	1,90	0,2680
0,11	0,9266	0,65	0,6373	1,95	0,2649
0,12	0,9202	0,66	0,6329	2,00	0,2500
0,13	0,9138	0,67	0,6285	2,05	0,2415
0,14	0,9075	0,68	0,6242	2,10	0,2333
0,15	0,9013	0,69	0,6199	2,15	0,2253
0,16	0,8950	0,70	0,6156	2,20	0,2177
0,17	0,8889	0,71	0,6114	2,25	0,2103
0,18	0,8827	0,72	0,6071	2,30	0,2031
0,19	0,8766	0,73	0,6029	2,35	0,1962
0,20	0,8706	0,74	0,5988	2,40	0,1895
0,21	0,8646	0,75	0,5946	2,45	0,1831
0,22	0,8586	0,76	0,5905	2,50	0,1768
0,23	0,8526	0,77	0,5864	2,55	0,1708
0,24	0,8468	0,78	0,5824	2,60	0,1650
0,25	0,8409	0,79	0,5784	2,65	0,1593
0,26	0,8351	0,80	0,5744	2,70	0,1539
0,27	0,8293	0,81	0,5704	2,75	0,1487
0,28	0,8236	0,82	0,5665	2,80	0,1435
0,29	0,8179	0,83	0,5626	2,85	0,1387
0,30	0,8123	0,84	0,5587	2,90	0,1340
0,31	0,8067	0,85	0,5548	2,95	0,1294
0,32	0,8011	0,86	0,5510	3,00	0,1250
0,33	0,7956	0,87	0,5472	3,05	0,1208
0,34	0,7901	0,88	0,5434	3,10	0,1167
0,35	0,7846	0,89	0,5396	3,15	0,1127
0,36	0,7792	0,90	0,5359	3,20	0,1088
0,37	0,7738	0,91	0,5322	3,25	0,1051
0,38	0,7684	0,92	0,5286	3,30	0,1016
0,39	0,7632	0,93	0,5249	3,35	0,09810
0,40	0,7579	0,94	0,5213	3,40	0,09475
0,41	0,7526	0,95	0,5177	3,45	0,09153
0,42	0,7475	0,96	0,5141	3,50	0,08841
0,43	0,7423	0,97	0,5105	3,55	0,08540
0,44	0,7372	0,98	0,5070	3,60	0,08247
0,45	0,7321	0,99	0,5035	3,65	0,07968
0,46	0,7270	1,00	0,5000	3,70	0,07695
0,47	0,7220	1,05	0,4830	3,75	0,07434
0,48	0,7170	1,10	0,4666	3,80	0,07181
0,49	0,7120	1,15	0,4507	3,85	0,06937
0,50	0,7071	1,20	0,4353	3,90	0,06700
0,51	0,7022	1,25	0,4205	3,95	0,06472
0,52	0,6974	1,30	0,4062	4,00	0,06250
0,53	0,6926	1,35	0,3923		
0,54	0,6878	1,40	0,3790		
0,55	0,6830	1,45	0,3661		
0,56	0,6783	1,50	0,3536		
0,57	0,6736	1,55	0,3416		
0,58	0,6690	1,60	0,3299		
0,59	0,6644	1,65	0,3187		
0,60	0,6598	1,70	0,3078		
0,61	0,6552	1,75	0,2973		
0,62	0,6507	1,80	0,2872		
0,63	0,6462	1,85	0,2774		

Centro de Documentação Farmacéutica
 da Ordem dos Farmacêuticos

considerado (32 dias) inclui 0,32 *vidas médias*. A mesma equação (22) resolvida em ordem a $t_{1/2}$ dará a *vida média* do produto:

$$t_{1/2} = \frac{t}{n} = \frac{32}{0,32} = 100 \text{ dias}$$

A equação (19) permitirá, por seu turno, calcular a velocidade específica (K) do processo de decomposição, que, por hipótese, se admite ser de *primeira ordem*:

$$K = \frac{0,693}{t_{1/2}} = \frac{0,693}{100} = 0,00693 \text{ dias}^{-1}$$

Tal como fizemos para os processos de *ordem zero*, também aqui poderemos deduzir o chamado *tempo de estabilidade* (T_E), ou seja, o tempo em que a degradação do produto activo atinge 10 % da concentração inicial ($C_t = \frac{9}{10} C_o$).

Introduzindo este valor de C_t na equação (16) teremos, sucessivamente:

$$\log \frac{9}{10} = \frac{K t_E}{2,303}$$

$$2,303 \log \frac{9}{10} = K t_E$$

$$t_E = \frac{0,1054}{K} \quad (23)$$

ou, relacionando com a *vida média* ($t_{1/2}$)

$$t_E = 0,1521 t_{1/2} \quad (24)$$

C) Reacções de segunda ordem

Consideremos o processo de saponificação do acetato de etilo, à temperatura constante de 25° C:



e designemos por A o acetato de etilo e por B o hidróxido de sódio. Dependendo a velocidade da reacção das concentrações de A e B , a velocidade de decomposição de A será igual à velocidade de decomposição de B e ambas serão proporcionais ao produto das concentrações dos reagentes:

$$\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = K [A] [B] \quad (25)$$

Designando por A_o e B_o as concentrações de A e B no tempo zero e por x a concentração, em moles/litro, que, de uma e outra substância, reage no tempo t , poderemos escrever:

$$\frac{dx}{dt} = K (A_o - x) (B_o - x) \quad (26)$$

em que $\frac{dx}{dt}$ é a velocidade de reacção e $(A_o - x)$ e $(B_o - x)$ as concentrações

de A e B (moles/litro) remanescentes ao cabo do tempo t . Considerando a hipótese mais simples de A e B estarem presentes na mesma concentração molar ($A_0 = B_0$), teremos:

$$\frac{dx}{dt} = K (A_0 - x)^2 \quad (27)$$

Integrando esta expressão entre os valores de $x=0$ ($t=0$) e de $x=x$ ($t=t$), obteremos, sucessivamente:

$$\int_0^x \frac{dx}{(A_0 - x)^2} = K \int_0^t dt$$

$$\frac{1}{A_0 - x} - \frac{1}{A_0 - 0} = Kt$$

$$\frac{x}{A_0 (A_0 - x)} = Kt \quad (28)$$

ou

$$K = \frac{1}{A_0 t (A_0 - x)} \quad (29) (*)$$

Considerando a hipótese mais geral de A e B existirem em concentrações diferentes, a integração da expressão (26) conduzirá a

$$\frac{2,303}{A_0 - B_0} \log \frac{B_0 (A_0 - x)}{A_0 (B_0 - x)} = Kt \quad (30)$$

ou

$$K = \frac{2,303}{t (A_0 - B_0)} \log \frac{B_0 (A_0 - x)}{A_0 (B_0 - x)} \quad (31)$$

Designando $(A_0 - x)$ e $(B_0 - x)$ por A_t e B_t , respectivamente, a equação (31) poderá tomar a seguinte forma:

$$K = \frac{2,303}{t (A_0 - B_0)} \log \frac{B_0 A_t}{A_0 B_t} \quad (32)$$

Voltemos ao exemplo do acetato de etilo e suponhamos que as concentrações iniciais de um e outro reagente tem o mesmo valor de 0,01 moles/litro.

Verificando-se, experimentalmente, que a concentração de Na OH que reage durante 20 minutos é de 0,00566 moles/litro, teremos para A_t ou $(A_0 - x)$, o valor:

$$A_0 - x = 0,01000 - 0,00566 = 0,00434 \text{ moles/litro}$$

(*) Designando $(A_0 - x)$ por A_t (concentração remanescente ao cabo do tempo t), a equação (29) poderá tomar esta outra forma:

$$K = \frac{1}{A_{0t}} \frac{A_0 - A_t}{A_t}$$

Introduzindo este valor de A_t na expressão (29), poderemos calcular a velocidade específica do processo de saponificação do acetato de etilo:

$$K = \frac{1}{0,01 \times 20} \cdot \frac{0,00566}{0,00434} = 6,2 \text{ litros moles}^{-1} \text{ minutos}^{-1}$$

Justificam-se, fàcilmente, as unidades por que se exprime K nos processos de *segunda ordem*, se atendermos às equações (29) e (32), e às dimensões habituais de A_o , B_o , A_t e B_t (moles/litro) e de t (minutos).

Tal como sucede nas reacções de *ordem zero* e de *primeira ordem*, poder-se-á calcular K pelo método gráfico, coordenando em abcissas e ordenadas, respectivamente,

os valores de $\frac{A_o - A_t}{A_o A_t}$ com os tempos em que as determinações de

A_t foram efectuadas. Tratando-se de um processo de *segunda ordem* em que A_o e B_o são iguais, a linha obtida será necessariamente uma recta, cuja inclinação será igual a K . Na hipótese de A_o e B_o serem diferentes, marcar-se-ão em abcissas os

valores de $\log \frac{B_o A_t}{A_o B_t}$, obtendo-se uma linha recta cuja inclinação é igual ao

quociente:

$$\frac{(A_o - B_o) K}{2,303}$$

de onde, fàcilmente, se extrairá o valor de K .

Também nos processos de *segunda ordem* se poderá considerar a *vida média* ou *tempo de semi-vida* ($t_{1/2}$), sempre que as concentrações iniciais dos 2 reagentes sejam idênticas ($A_o = B_o$); fáci será então deduzir da equação (29) a relação

existente entre a *vida média* e K , uma vez que $x = \frac{A_o}{2} - A_t$:

$$K = \frac{1}{A_o t_{1/2}} \cdot \frac{A_o - \frac{A_o}{2}}{\frac{A_o}{2}} = \frac{1}{A_o t_{1/2}}$$

$$K t_{1/2} = \frac{1}{A_o}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{A_o K} \quad (33)$$

No exemplo atrás referido, a *vida média* será, como é óbvio:

$$t_{1/2} = \frac{1}{6,52 \times 0,01} = 15,3 \text{ minutos}$$

Definidas as relações matemáticas entre as concentrações e os tempos de decomposição, estamos aptos, finalmente, a determinar a *ordem* das reacções responsáveis pelas alterações. São três, fundamentalmente, os métodos utilizados para esse efeito:

1. *Método de substituição.* Determinam-se, experimentalmente, as concentrações remanescentes de droga após diversos tempos de armazenagem. Recorrendo às equações que definem as várias ordens (equações (10), (15), (29) e (32)) calcula-se *K* para cada par de valores de concentração e de tempo. Desde que a equação escolhida para efectuar o cálculo corresponda exactamente à *ordem* da reacção em causa, *K* permanecerá constante, dentro dos limites normais de variação experimental, para os diversos pares de valores de concentração e tempo.

2. *Método gráfico.* O estudo gráfico da concentração remanescente da droga após diversos tempos de armazenagem, a uma dada temperatura constante, representa o método mais prático para se calcular o *número de ordem* do processo de decomposição. Assim, se se obtiver uma linha recta entre os valores de concentração e os tempos, trata-se como é óbvio, de uma reacção de *ordem zero*, definida pela conhecida equação (10):

$$C_t = C_0 - K t$$

Se para obter uma linha recta for necessário coordenar os tempos com os logaritmos das concentrações, estaremos perante um processo de *primeira ordem*, expresso pela equação (15):

$$\log C_t = \log C_0 - \frac{K t}{2,303}$$

Finalmente, se a relação linear só for possível coordenando os tempos com os inversos das concentrações $\frac{1}{A_t}$, teremos uma reacção de *segunda ordem*

definida pela já referida equação (28):

$$\frac{x}{A_0 (A_0 - x)} = K t$$

ou

$$\frac{A_0 - A_t}{A_0 A_t} = K t \quad (34)$$

ou, ainda

$$\frac{1}{A_t} = \frac{1}{A_0} + K t \quad (35)$$

reacção essa em que A_0 e B_0 são iguais. Se as concentrações iniciais de *A* e *B*

são diferentes, obter-se-á uma relação linear quando se coordenem os valores de t com os logaritmos de $\frac{A_t}{B_t}$, conforme se pode deduzir da já mencionada expressão (32):

$$\log \frac{B_o A_t}{A_o B_t} = \frac{K t (A_o - B_o)}{2,303} \quad (36)$$

$$\log \frac{A_t}{B_t} = \log \frac{A_o}{B_o} + \frac{K t (A_o - B_o)}{2,303} \quad (37)$$

3. *Método das vidas médias.* Recordemos as equações que definem a *vida média* para os três tipos de reacções de maior interesse para o estudo da estabilidade dos medicamentos:

$$t_{1/2} = \frac{C}{2K} \quad (\text{Reacções de ordem zero})$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (\text{Reacções de primeira ordem})$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{A_o K} \quad (\text{Reacções de segunda ordem, em que } A_o = B_o)$$

Vê-se, assim, que a *vida média* é proporcional à concentração inicial da droga nos processos de *ordem zero*, independente da concentração nas reacções de *primeira ordem* e proporcional ao inverso da concentração nos processos de *segunda ordem*, em que as concentrações iniciais dos 2 reagentes são idênticas. Fácil será concluir que a *vida média* é, em todos os casos, proporcional ao quociente $\frac{1}{C_o^{n-1}}$, em que n representa o *número de ordem* da reacção.

Suponhamos que um dado processo de decomposição é estudado em 2 preparados de concentração inicial diferente ($C_{o(1)}$ e $C_{o(2)}$); as respectivas *vidas médias* ($t_{1/2(1)}$ e $t_{1/2(2)}$) estarão relacionadas como se segue:

$$\frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}} = \frac{(C_{o(2)})^{n-1}}{(C_{o(1)})^{n-1}} = \left(\frac{C_{o(2)}}{C_{o(1)}} \right)^{n-1} \quad (38)$$

Convertendo na forma logarítmica, teremos:

$$\log \frac{t_{1/2(1)}}{t_{1/2(2)}} = (n-1) \log \frac{C_{o(2)}}{C_{o(1)}} \quad (39)$$

donde

$$n = \frac{\log (t_{1/2(1)} / t_{1/2(2)})}{\log (C_{o(2)} / C_{o(1)})} + 1 \quad (40)$$

Fazendo para cada um dos preparados o estudo gráfico entre as respectivas concentrações e os tempos de armazenagem, à mesma temperatura constante, fácil será calcular os valores de t para os quais as concentrações estão reduzidas a $\frac{1}{2} C_{o(1)}$ e $\frac{1}{2} C_{o(2)}$. Introduzindo estes tempos, que correspondem, como é óbvio, às *vidas médias* $t_{\frac{1}{2}(1)}$ e $t_{\frac{1}{2}(2)}$, na equação (40), obter-se-á directamente o número de *ordem* (n) do processo. Para melhor esclarecimento deste método, consideremos o caso de uma reacção de *primeira ordem*: sabendo-se que a *vida média* é aqui independente de C_o , é evidente que $t_{\frac{1}{2}}$ terá o mesmo valor em ambos os pre-

parados; nestas condições, o termo $\frac{\log(t_{\frac{1}{2}(1)}/t_{\frac{1}{2}(2)})}{\log(C_{o(2)}/C_{o(1)})}$ será igual a 0, pelo que n terá, realmente, o valor 1.

Qualquer que seja o tipo de alteração a que uma dada droga está sujeita, o cálculo do número de *ordem* da reacção química responsável por essa decomposição e a determinação da sua *vida média* ou do *tempo de estabilidade* implicarão sempre a verificação experimental das quantidades de droga existentes no preparado galénico ao cabo de diversos tempos de armazenagem, a temperatura constante. Sucede, porém, que para a grande maioria das preparações farmacêuticas os tempos necessários para se observarem variações significativas de concentração tornam-se demasiado longos quando o processo de decomposição é estudado à temperatura habitual de armazenagem. O problema resolve-se, entretanto, facilmente, submetendo os preparados a temperaturas mais elevadas e aumentando, desta maneira, a velocidade das respectivas reacções de decomposição. Foi GARRETT quem, pela primeira vez, demonstrou ser possível prever a estabilidade de uma preparação líquida à temperatura normal de armazenagem, calculando, simplesmente, a velocidade do processo de decomposição da substância activa a temperaturas mais elevadas. Baseia-se este método na aplicação da fórmula de ARRHENIUS que define a influência da temperatura sobre a velocidade específica de reacção:

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{RT} \quad (41)$$

ou

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{2,303 RT} \quad (42)$$

em que K representa a velocidade específica do processo de degradação, A uma constante denominada *factor de frequência*, E_a a *energia de activação*, R a constante dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta a que decorre a reacção. Por meio desta fórmula, torna-se possível calcular K para diversas temperaturas, desde que se conheçam os valores de A e E_a para o processo de degradação em estudo. Estes podem determinar-se calculando K para diferentes temperaturas (por ex. 50°, 60° e 70° C) e fazendo, depois, o estudo gráfico entre os valores de $\log K$ e de $\frac{1}{T}$. Assim, marcando em abcissas $\log K$ (*) e em ordenadas os recí-

(*) Simplifica-se o estudo gráfico usando papel semilogarítmico e marcando, directamente, em abcissas os valores de K .

procos das temperaturas absolutas (*), obter-se-á uma recta descendente (Vidé equação (42)), cuja inclinação é dada por $-E_a/2,303 R$. Ao mesmo tempo que se deduz o valor de E_a pode calcular-se, fàcilmente, a constante A , prolongando a recta até interceptar o eixo das abcissas; o ponto de intersecção das 2 linhas dará imediatamente o valor de $\log A$ ($\log A = \log K$, para $\frac{1}{T} = 0$).

Poderá haver vantagem em fazer o gráfico não com os valores de $\log K$ mas sim com os de $\log t_{1/2}$. As relações existentes entre $\log t_{1/2}$ e a temperatura absoluta estão expressas na seguinte equação geral.

$$\log t_{1/2} = \frac{E_a}{2,303 R} \cdot \frac{1}{T} - \text{Constante} \quad (43)$$

em que o termo designado por *constante* depende da *ordem* do processo de degradação: nos de *ordem zero* é igual a $(\log A + 0,30103 - \log C_0)$; nos de *primeira ordem* corresponde a $(\log A - \log 0,693)$; nos de *segunda ordem* ($A_0 = B_0$) tem o valor de $(\log A_0 + \log A)$. Chega-se fàcilmente à equação (43) deduzindo os valores de K das fórmulas que definem a *vida média* dos processos de *ordem zero*, *um e dois* e introduzindo-os na expressão (42), para finalmente a resolver em ordem a $\log t_{1/2}$.

A expressão gráfica da equação (43) será necessariamente uma recta ascendente, cuja inclinação corresponde a $E_a/2,303 R$. Ao mesmo tempo que se deduz o valor de E_a , poder-se-á calcular, também neste gráfico, o valor de A , prolongando a recta até cortar o eixo das abcissas: o ponto de intersecção das 2 linhas corresponderá, neste caso, à *constante* da equação (43), de onde será fácil deduzir o valor de $\log A$.

Conhecidos A e E_a , por um ou outro processo gráfico, para a reacção em causa, não haverá dificuldade em calcular a velocidade específica de degradação à temperatura habitual de armazenagem, bastando para isso recorrer à equação (42) e substituir T pela temperatura absoluta, correspondente.

E_a pode ser calculado, ainda, com base na equação (42), sem ser necessário efectuar o estudo gráfico entre os valores de K e de $\frac{1}{T}$. Consiste o processo em

determinar K apenas para duas temperaturas diferentes T_1 e T_2 e introduzir os respectivos valores na equação (42). Teremos então:

$$\log K_2 = \log A - \frac{E_a}{2,303 R} \cdot \frac{1}{T_2}$$

$$\log K_1 = \log A - \frac{E_a}{2,303 R} \cdot \frac{1}{T_1}$$

Subtraindo membro a membro estas duas expressões, resultará

$$\log \frac{K_2}{K_1} = \frac{E_a}{2,303 R} \cdot \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1} \quad (44)$$

(*) Para maior facilidade no traçado da curva, é conveniente usar nas ordenadas valores de $\frac{1}{T} \times 10^3$.

TABELA 2

Energia de Activação, Calorias/Mole	5°		15°		25°		33°		45°		55°		65°		75°		85°		95°		105°		115°		125°		
	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	a	R	
8.000	1,65	1,60	1,55	1,50	1,47	1,44	1,41	1,38	1,36	1,34	1,32	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
10.000	1,88	1,80	1,72	1,67	1,62	1,57	1,53	1,50	1,46	1,44	1,41	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
12.000	2,12	2,02	1,93	1,85	1,78	1,72	1,67	1,62	1,58	1,55	1,51	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48
14.000	2,41	2,27	2,15	2,05	1,96	1,88	1,82	1,76	1,71	1,66	1,62	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58	1,58
16.000	2,72	2,55	2,40	2,27	2,16	2,07	1,98	1,91	1,84	1,79	1,73	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
18.000	3,10	2,87	2,68	2,52	2,38	2,26	2,15	2,06	1,99	1,92	1,86	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
20.000	3,52	3,23	2,99	2,79	2,62	2,48	2,35	2,24	2,15	2,07	1,99	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92
22.000	3,97	3,63	3,34	3,10	2,89	2,72	2,56	2,43	2,31	2,22	2,13	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
24.000	4,53	4,08	3,72	3,43	3,17	2,97	2,79	2,64	2,50	2,39	2,28	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
26.000	5,10	4,58	4,15	3,79	3,50	3,25	3,04	2,85	2,70	2,57	2,44	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33
28.000	5,81	5,15	4,63	4,21	3,86	3,56	3,30	3,10	2,92	2,76	2,62	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49	2,49
30.000	6,55	5,79	5,16	4,65	4,24	3,90	3,60	3,35	3,14	2,96	2,80	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66
40.000	12,4	10,04	8,94	7,78	6,88	6,14	5,53	5,00	4,59	4,26	3,96	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67
50.000	23,1	18,65	15,5	13,0	11,1	9,67	8,46	7,46	6,72	6,18	5,56	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11
60.000	43,4	33,5	26,6	21,8	18,0	15,2	12,9	11,2	9,88	8,76	7,85	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06
70.000	81,4	60,4	46,1	36,2	29,2	23,9	20,0	16,8	14,5	12,5	11,1	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88	9,88
80.000	151	109	80,2	60,4	47,3	37,6	30,4	25,3	21,2	18,0	15,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6
90.000	284	195	139	102	76,3	59,1	46,5	37,7	31,2	26,1	22,0	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7
100.000	584	347	237	169	124	92,8	70,8	58,4	45,6	37,3	31,2	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1

Se em lugar dos valores de K , se determinarem as *vidas médias* $t_{\frac{1}{2}(1)}$ e $t_{\frac{1}{2}(2)}$, e estas forem introduzidas na equação (43), chegar-se-á, pelo mesmo raciocínio, à expressão:

$$\log \frac{t_{\frac{1}{2}(1)}}{t_{\frac{1}{2}(2)}} = \frac{E_a}{2,303 R} \cdot \frac{(T_1 - T_2)}{T_2 T_1} \quad (45)$$

Uma vez que se conheçam os valores de K_1 e K_2 , $t_{\frac{1}{2}(1)}$ e $t_{\frac{1}{2}(2)}$ e T_1 e T_2 , fácil será calcular, por meio das equações (44) e (45), a *energia de activação* (E_a) do processo de degradação em estudo.

Conhecido o valor de E_a , as mesmas expressões (44) e (45) permitirão determinar a velocidade específica (K_1) ou a *vida média* ($t_{\frac{1}{2}(2)}$) para qualquer temperatura (T_1), desde que se calculem os valores de K e $t_{\frac{1}{2}(2)}$ para uma outra temperatura superior (T_1).

A determinação de K e $t_{\frac{1}{2}}$ para diversas temperaturas, e nomeadamente para a temperatura normal de conservação dos medicamentos, torna-se muito mais prática e rápida quando se disponha de uma tabela que indique para diferentes valores de E_a e diversas zonas térmicas, a variação sofrida por $t_{\frac{1}{2}}$ para uma dada modificação de temperatura (por ex. 10°). Encontra-se uma tabela deste tipo em HUS'AS — PHARMACEUTICAL DISPENSING (MARTIN, 1959), pág. 567, na qual se indicam os factores de variação de $t_{\frac{1}{2}}$ para modificações térmicas de 10° dentro de uma zona de temperaturas compreendidas entre 5° e 125° C, e para *energias de activação* desde 8000 a 100 000 calorias/mole (Tabela II). A elaboração desta tabela baseia-se na equação (45), calculando-se o quociente $\frac{t_{\frac{1}{2}(1)}}{t_{\frac{1}{2}(2)}}$ para diversos valores de E_a (800 a 100 000 cal./mole) e para diferentes temperaturas, intervaladas de 10° (5°-15°, 15°-25°, 25°-35°, 35°-45°, 45°-55° e assim, sucessivamente, até 115°-125°).

Para apreciarmos até que ponto se torna fácil o emprego desta tabela, consideremos o caso de um processo de degradação, cuja *energia de activação* é de 20 000 cal./mole, e do qual conhecemos a *vida média* a 55° ($t_{\frac{1}{2}(55^\circ)}$). A tabela II mostra, então, que para obter a *vida média* a 45° ($t_{\frac{1}{2}(45^\circ)}$), bastará multiplicar $t_{\frac{1}{2}(55^\circ)}$ pelo factor 2,62:

$$t_{\frac{1}{2}(45^\circ)} = t_{\frac{1}{2}(55^\circ)} \times 2,62$$

Se quisermos agora calcular a *vida média* a 35° multiplicaremos $t_{\frac{1}{2}(45^\circ)}$ pelo factor correspondente ao intervalo de 35°-45°, ou seja, 2,79.

$$t_{\frac{1}{2}(35^\circ)} = t_{\frac{1}{2}(45^\circ)} \times 2,79 = t_{\frac{1}{2}(55^\circ)} \times 2,62 \times 2,79$$

Se pretendermos saber, ainda, a *vida média* a 25° (que pode considerar-se como a temperatura normal de armazenagem) multiplicaremos $t_{\frac{1}{2}(35^\circ)}$ pelo valor 2,99, correspondente ao intervalo de 25°-35°.

$$t_{\frac{1}{2}(25^\circ)} = t_{\frac{1}{2}(35^\circ)} \times 2,99 = t_{\frac{1}{2}(55^\circ)} \times 2,62 \times 2,79 \times 2,99$$

Conclui-se, pois, que, para se obter a *vida média* à temperatura habitual de armazenagem (25° C), a partir do valor conhecido de $t_{\frac{1}{2}(55^\circ)}$, bastará multiplicar

este último pelos factores correspondentes aos intervalos térmicos de 55°-45°, 45°-35° e 35°-25°.

A tabela II não se limita, porém, a simplificar a determinação dos valores de K e $t_{1/2}$. Quando utilizada de maneira inversa, permite calcular, facilmente também, a *energia de activação* de qualquer processo de decomposição. Impõe-se, para tal, determinar, previamente, a *vida média* do preparado a 2 temperaturas superiores à normal e diferindo entre si de 10°: podem escolher-se, por exemplo, as temperaturas de 65° e 75° com as quais obteremos os valores de $t_{1/2(65^\circ)}$ e $t_{1/2(75^\circ)}$. Dividindo $t_{1/2(65^\circ)}$ por $t_{1/2(75^\circ)}$, teremos, como é evidente, o factor de variação térmica da *vida média* do preparado, o qual, uma vez localizado na tabela II, entre os factores da coluna vertical correspondente ao intervalo térmico de 65°-75°, nos dará, directamente ou por interpolação, a *energia de activação* do processo.

Conhecido, assim, E_a , ficamos aptos a conhecer a *vida média* do mesmo sistema a 25° C. Basta, para isso, procurar na tabela II, directamente ou por interpolação, os factores de variação de $t_{1/2}$ para os intervalos de temperatura de 75°-65° (f_1), 65°-55° (f_2), 55°-45° (f_3), 45°-35° (f_4) e 35°-25° (f_5), na coluna horizontal correspondente à *energia de activação* do processo. A *vida média* à temperatura normal de armazenagem (25° C) será, pois:

$$t_{1/2(25^\circ)} = t_{1/2(75^\circ)} \times f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_4 \times f_5$$

Apesar da simplicidade deste processo de cálculo, diversos AA. dão a sua preferência ao método gráfico, que consideram mais prático para a previsão da estabilidade dos medicamentos. Este método poderá ser praticado do seguinte modo: divide-se o preparado em 3 amostras que se submetem, durante certo tempo, a 50°, 60° e 70° C, respectivamente; doseando a substância activa, periodicamente, em cada uma das amostras e fazendo o estudo gráfico entre as concentrações e os tempos, verifica-se o número de *ordem* do processo de degradação e calcula-se o valor de K para cada uma das temperaturas. Conhecidos os valores de K , constrói-se um segundo gráfico em papel semilogarítmico, marcando em ordenadas os inversos das temperaturas absolutas, multiplicados por 10³ (*), e em abcissas os valores de K . Prolongando-se o traçado gráfico até atingir a temperatura de 25° C, fica-se apto, finalmente, a calcular, por simples interpolação, a *velocidade específica* K e, ao mesmo tempo, a *vida média* e o *tempo de estabilidade* do preparado à temperatura normal de armazenagem.

da Ordem dos Farmacêuticos

Definidas as leis físico-químicas e as expressões matemáticas que permitem o estudo acelerado da estabilidade dos medicamentos, uma questão fundamental se torna lícito apresentar: será que todos os processos de alteração dos preparados farmacêuticos obedecem, rigorosamente, às equações que definem a velocidade de reacção e as suas relações com a temperatura?

A resposta é, sem dúvida, afirmativa, se bem que a natureza física, diversa, das múltiplas formas farmacêuticas imponha uma certa diferenciação de processos. Assim, ao empreender-se o estudo acelerado da estabilidade, deve tomar-se em consideração a existência de 3 grupos de sistemas.

1. Sistemas líquidos, homogéneos
2. Sistemas líquidos, heterogéneos
3. Sistemas sólidos, heterogéneos.

(*) 3,10 para 50°, 3,00 para 60° e 2,91 para 70°.

Incluem-se no primeiro grupo, todas as soluções medicamentosas, independentemente do dissolvente usado na sua preparação. É nelas, sem dúvida, que o problema da estabilização se reveste de maior acuidade, sendo três as causas fundamentais de alteração dos princípios activos em solução: hidrólises, oxidações e isomerizações. As decomposições consistem, na grande maioria dos casos, em reacções de *primeira ordem* e, menos vezes, de *segunda ordem*, tornando-se possível em todas elas efectuar ensaios precisos de alteração acelerada e prever com rigor a estabilidade.

O segundo grupo de sistemas inclui, fundamentalmente, as formas farmacêuticas obtidas por emulsionamento ou suspensão. Reportando-nos, exclusivamente, à sua estabilidade química e admitindo que são as próprias substâncias activas que se encontram emulsionadas ou suspensas, compreende-se que a grande maioria dos processos de degradação seja de *ordem zero*. Tal como nas formas do grupo precedente, não há dificuldades de maior na realização dos ensaios de alteração acelerada com as suspensões e emulsões, podendo prever-se, com segurança, a sua estabilidade no tempo.

Finalmente, o terceiro grupo de sistemas compreende todas as formas farmacêuticas sólidas, como pós, cápsulas, comprimidos, pílulas, pastilhas, granulados, drageias e supositórios. São mínimas, neste caso, as possibilidades de reacção química, se bem que haja exemplos de quebra de actividade, como resultado de fenómenos de oxidação, hidrólise e racemização. A presença quase inevitável de uma certa humidade residual nas formas sólidas, combinada com a acção do ar, luz e calor, pode realmente provocar degradações químicas. Mas se é certo que as formas sólidas oferecem melhores condições de conservação que as líquidas, não é menos verdade que o estudo acelerado da sua estabilidade é sempre muito problemático, conduzindo a resultados bastante falíveis. Por isso, é norma corrente atribuir às preparações sólidas um *tempo de estabilidade* igual ao das formas líquidas correspondentes.

Chegamos, assim, à conclusão, que, não obstante o empirismo e a incerteza dos resultados obtidos com as formas sólidas, de resto as mais estáveis, a aplicação das leis fundamentais de cinética química e da equação de ARRHENIUS nos ensaios de conservação dos medicamentos veio resolver um importante problema da tecnologia farmacêutica, tornando possível prever, com rapidez e segurança, a estabilidade de um grande número de preparações farmacêuticas.

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

III SECÇÃO

ESTEREOISOMERIA E ACTIVIDADE BIOLÓGICA

J. POLÓNIA

1.º Assistente da Fac. de Farmácia do Porto

Como todos sabemos, são numerosos os exemplos de compostos que, possuindo a mesma fórmula de estrutura, apresentam, no entanto, diferenças mais ou menos acentuadas quanto às suas propriedades. Assim, a fórmula de estrutura CHO-CH(OH)-CH₂OH, correspondente ao Aldeído glicérico, pode representar duas substâncias, diferindo entre si pelo sentido do desvio que imprimem ao plano de polarização da luz, isto é, essa estrutura pode corresponder ao Aldeído glicérico dextrógiro e ao Aldeído glicérico levógiro, cuja mistura equimolecular originará uma substância inactiva perante a luz polarizada.

A fórmula de estrutura COOH-CH=CH-COOH, correspondente ao Butenodioco, pode representar dois compostos, os ácidos Maleico e Fumárico, diferindo entre si pelo ponto de fusão, solubilidade, força ácida, calor de combustão, etc.

A estrutura ou C₁₀H₁₈, correspondente ao hidrocarboneto Decalina, pode representar dois compostos diferindo entre si pela densidade, ponto de ebulição, índice de refração, calor de combustão, etc.

A estrutura ou C₆H₁₂, correspondente ao Ciclohexano ou Hexahidrobenzeno pode representar duas formas diferentes daquele composto, diferindo entre si pelo calor de combustão.

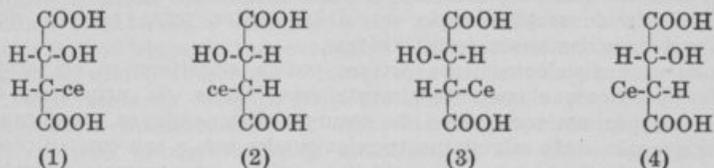
Possuindo idênticas constituições químicas, os diversos compostos referentes a cada um dos exemplos apontados diferem entre si na distribuição dos átomos no espaço designando-se por Estereoisómeros. Diz-se, como sabemos, que as respectivas moléculas apresentam diferentes configurações e, para o caso do Ciclohexano, diferentes conformações, não correspondendo, neste caso, os respectivos compostos a verdadeiros estereoisómeros.

Com os estereoisómeros constituem-se dois grandes grupos: estereoisómeros ópticos e estereoisómeros geométricos, apresentando os primeiros dissimetria molecular, pelo menos em duas das suas formas, da qual resulta a sua actividade em relação ao plano de polarização da luz; os estereoisómeros geométricos são estereoisómeros inactivos perante a luz polarizada em qualquer das suas formas.

O caso atrás citado do Aldeído glicérico corresponde a um exemplo clássico de estereoisomeria óptica; o composto possui um átomo de carbono assimétrico, isto é, como todos sabem, um átomo de carbono a que se ligam 4 grupos todos diferentes. A representação tetraédica desse carbono pode fazer-se com um modelo molecular (*), cuja projecção no plano corresponde a . Neste modelo é impossível estabelecer um plano de simetria e com os mesmos substituintes apenas é possível construir um outro modelo não sobreponível ao primeiro e que corresponderá à sua imagem especular. Os compostos correspondentes a estas duas formas designam-se por Enantiomorfos; um será dextrógiro e o outro levógiro, possuindo o mesmo valor o correspondente ângulo de desvio do plano de

(*) Durante a exposição verbal do assunto deste trabalho recorreu-se frequentemente ao emprego de modelos moleculares.

polarização da luz e será esta a única diferença a apontar quanto às suas propriedades. Se o composto possui mais de um átomo de carbono assimétrico aumenta o número de estereoisómeros. Assim, serão 4 os estereoisómeros correspondentes ao 2-Hidroxi-3-clorobutanodioico:



Os compostos (1) (2) e (3) (4) correspondem, quanto à configuração dos carbonos assimétricos, a pares de enantiomorfos e diferem entre si apenas pelo sentido do desvio que imprimem ao plano de polarização da luz; (1) (3), (2) (3), (1) (4) e (2) (4) não são enantiomorfos mas diastereoisómeros diferindo pela solubilidade, ponto de fusão, poder rotatório, etc.

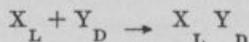
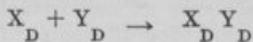
No caso do Butenodioico, considerada a rigidez da dupla ligação (ligação σ + ligação π), a posição espacial dos substituintes dos carbonos insaturados pode apresentar-se de duas formas: considerando um plano tangencial ao plano representado num modelo pela dupla ligação, os substituintes iguais poderão estar para o mesmo lado ou para lados opostos desse plano: o primeiro designa-se por composto «cis» e o segundo por «trans».

Na Decalina as ligações entre os carbonos terciários e os átomos de hidrogénio poderão estar dirigidas para o mesmo lado ou para lados diferentes de um plano tangencial e esses átomos de carbono e aproximadamente paralelo aos dois ciclos, tendo-se, respectivamente, a *cis*-Decalina e a *trans*-Decalina. Nos respectivos modelos, observa-se facilmente as diferentes distâncias entre os substituintes em cada um destes isómeros.

No Ciclohexano, considerada a livre rotação dos átomos em torno das ligações, atingem-se os valores mais próximos dos ângulos normais de valência para as formas espaciais designadas por «cadeira» e «barco», os dois estados conformacionais a que corresponde maior estabilidade. As ligações entre os carbonos e os substituintes dizem-se, como sabemos, axiais e equatoriais, podendo algumas propriedades de um composto depender do facto de os substituintes serem axiais ou equatoriais. Assim, considere-se por exemplo, um composto 1,2-*trans*ciclohexanodi-substituído, com ambos os substituintes axiais. Uma reacção do tipo E₂ verificar-se-á com certa facilidade, uma vez que são coplanares os 4 centros envolvidos na reacção; se o composto é do tipo 1,2-*cis*, os 4 centros deixam de ser coplanares e a reacção de eliminação ou se não verifica ou é mais difícil.

As diferenças entre os estereoisómeros no que respeita ao seu comportamento químico e físico-químico, observam-se também, muito frequentemente, quanto às suas propriedades bioquímicas.

Pode dizer-se que a primeira observação relativa à diferença de actividade biológica dos estereoisómeros se deve a PIUTTI, em 1886, ao conseguir obter Asparagina dextrógira das águas mães da cristalização de Asparagina levógira e ao verificar que aquela era doce e esta insípida. Para explicar esta diferença de sabor e outras diferenças observadas em casos semelhantes, PASTEUR sugeriu que dois enantiomorfos, formando com outras substâncias, compostos de propriedades químicas e físicas diferentes, poderiam formar também, com receptores celulares assimétricos, compostos com propriedades fisiológicas diferentes, isto é:



Se X_D e X_L são enantiomorfos, exceptuando a actividade óptica, existe identidade entre as suas propriedades físico-químicas; $X_D Y_D$ e $X_L Y_D$ são diastereoisómeros e diferem em muitas das suas propriedades, admitindo PASTEUR que difeririam também nas propriedades biológicas. O facto observado por PASTEUR da especificidade de metabolização dos D-tartaratos pelas espécies do género *Penicilium* era uma das bases desta hipótese.

Os compostos fisiologicamente activos podem classificar-se em «estruturalmente não-específicos» e «estruturalmente específicos». Os primeiros, actuando provavelmente, por um mecanismo de natureza físico-química, provocam efeitos fisiológicos que não estão estreitamente relacionados com a sua composição química e assim, por exemplo, entre os anestésicos gerais encontram-se substâncias de composição muito diferente.

As substâncias designadas por «estruturalmente específicas» devem a sua acção, provavelmente, ao facto de actuarem num receptor específico existente num tecido ou num sistema enzimático, verificando-se a reacção de forma reversível, com uma constante de equilíbrio dependendo da forma mais ou menos intensa como o composto se liga com o receptor.

A acção fisiológica de um composto depende, por um lado, da maior ou menor facilidade com que é atingido o local de acção e, por outro lado, uma vez atingido esse local, da reacção aí provocada.

Entre outros factores, há que considerar o poder de penetração através das membranas; a adsorção às superfícies; reactividade química (afectando a distribuição e o metabolismo do composto no organismo); carácter iónico (afectando frequentemente os restantes factores que vimos considerando), solubilidade nos lipóides (influenciando a penetração nas membranas e o local de fixação de um composto) e factores de ordem estérica, afectando a reactividade de um grupo na molécula e, sobretudo, a adsorção específica das moléculas à superfície de um receptor.

BECKETT & CASY (J. P. P. 7, 433 (1955) numa interessante revisão sobre o assunto aqui tratado, consideram três aspectos nas diferenças de comportamento dos pares de estereoisómeros em relação com a sua acção biológica. Esses aspectos dizem respeito: à diferença na distribuição dos isómeros; à diferença das propriedades da combinação «isómero-receptor»; à natureza da ligação dos isómeros na superfície do receptor. Há casos em que dois estereoisómeros podem provocar o mesmo efeito biológico, desde que atinjam o local de acção nas mesmas quantidades. Os efeitos são, por certo, quantitativamente diferentes se, embora introduzidos no organismo em idênticas quantidades, atingem o local de acção em quantidades diferentes.

Considerando o caso de dois enantiomorfos, pode aceitar-se que, reagindo ambos com um composto ópticamente activo existente no organismo, originem dois diastereoisómeros possuindo, por exemplo, diferentes solubilidades e, portanto, com diferente capacidade de penetração na célula ou diferente capacidade de difusão tecidual. Pode também acontecer que um dos enantiomorfos, antes de atingir o local de acção seja metabolizado por um sistema enzimático específico e destruído em maior ou menor escala. Assim, por exemplo, o Ácido D-ascórbico, administrado a cobaias com escorbuto, é rapidamente metabolizado e eliminado sem manifestar qualquer acção antiescórbitica; no fígado do rato encontram-se enzimas que hidrolisam muito mais rapidamente os L-aminoácidos acilados que os correspondentes enantiomorfos.

Entre dois isómeros geométricos verificam-se por vezes grandes diferenças nas suas propriedades físicas e químicas, o que pode resultar das distâncias espaciais a que se encontram os grupos activos.

Dois compostos diferindo somente na conformação de um substituinte podem atingir o local de acção em proporções diferentes, facto que pode depender das suas diferentes reactividades e da diferente forma como podem ser adsorvidos em certas superfícies. Assim, o Colesterol (OH 3β equatorial) é oxidado mais

difícilmente que o epicolesterol (OH, 3α axial); por outro lado, tal como se observa na cromatografia de esteroides, são mais fortemente adsorvidos os compostos com hidroxilos β -equatoriais que os compostos com hidroxilos α -axiais.

Outro aspecto da diferente acção biológica de dois estereoisómeros diz respeito às propriedades da combinação entre o composto e o receptor. A acção fisiológica de muitas substâncias é atribuída à sua combinação com um ou mais receptores celulares muitas vezes de tipo enzimático. Dois enantiómeros podem, por exemplo, combinar-se com o substrato somente através de dois pontos, fixando-se o terceiro substituinte de maneira indiferente. As combinações resultantes, análogas aos compostos diastereoisómeros, apresentarão propriedades diferentes, podendo justificar, pelo menos, variações quantitativas no efeito fisiológico provocado. Um exemplo clássico deste caso, corresponde ao da *levo* e da *dextro*-Adrenalina, em que a acção pressora da primeira é muito superior à da última (vasos da conjuntiva).

A combinação entre um estereoisómero biologicamente activo e um substrato (tecido ou sistema enzimático) pode ser considerada como efectuando-se através de «três pontos», isto é, de três dos substituintes de um átomo de carbono assimétrico. Se houver necessidade de justaposição destes três pontos para que se verifique uma dada acção fisiológica, compreende-se que o enantiómero do composto anterior seja inactivo. Este facto é perfeitamente ilustrado construindo os dois modelos correspondentes a um átomo de carbono assimétrico.

Uma outra situação corresponderá ao caso em que um enantiómero seja mais facilmente fixado que o outro, ficando a intensidade da acção dependente dessa maior ou menor facilidade. Se o composto mais activo sofre, antes de se fixar, uma ligeira modificação estrutural, pode originar um composto de acção antagonica, uma vez que, continuando a poder fixar-se no receptor bloqueia este e impede a fixação do composto activo.

A Epinina é uma amina vaso-pressora inactiva à luz polarizada, cuja estrutura se pode relacionar com a da Epinefrina por substituição de um H do carbono β da Epinina por um hidroxilo; *gravura 4 a L* (+) Epinefrina manifesta cerca da terça parte da actividade pressora da Epinina, manifestando a D (—) Epinefrina uma actividade cerca de 12 vezes a da Epinina. A fixação da Epinina no receptor seria menos perfeita que a da Epinefrina devógira, estando portanto o máximo de actividade ligado à presença, no carbono β , de um grupo básico, um grupo fenílico e um OH alcoólico de configuração D. Se este possui a configuração L o produto seria ainda fixado pelo receptor mas a acção seria menos intensa.

No caso da Sinefrina observa-se que o isómero dextrógiro neutraliza ou antagoniza a acção do levógiro. Neste caso os isómeros apresentam diferentes propriedades biológicas, uma vez que a fixação de um impede a fixação do outro.

Outro exemplo diz respeito à Riboflavina em que a epimerização de um dos centros de assimetria resulta a D-araboflavina, antagonista daquela.

Enquanto o Mentol possui um cheiro agradável de hortelã-pimenta, o Isomentol apresenta cheiro desagradável, diferindo os dois compostos apenas na conformação do grupo metílico (β -equatorial no primeiro e α -axial no segundo).

Dos isómeros conformacionais do Hexaclorociclohexano, apenas o composto designado por isómero γ (ou gamexano) manifesta acção insecticida.

O Cloranfenicol ou D-(—)-*treo*-p-nitrofenil-2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol é dotado de intensa actividade antibacteriana. Os compostos L-(+)-*treo*, D-(—)-*eritro* e D-(+)-*eritro* possuem actividade praticamente nula. Só o Cloranfenicol inibiria a síntese dos L-polipeptídeos e daí a sua exclusiva actividade.

A Penicilina natural origina, por hidrólise, a D-Penicilamina. As penicilinas sintéticas obtidas a partir deste aminoácido apresentam a mesma actividade do produto natural. As preparadas a partir do racemato manifestam metade da actividade e as obtidas a partir da L-Penicilamina são praticamente inactivas.

* *
*

Com estes simples exemplos quisemos evidenciar e recordar aspectos estereoquímicos relacionados com a actividade biológica de algumas substâncias. Aspectos mais complexos poderiam ter sido apresentados mas cremos que o exposto nos permite imaginar como é vasto e complicado um campo de trabalho que, para além do seu interesse de ordem especulativa, é de enorme importância nas suas implicações práticas. É actualmente muito vasta a bibliografia relativa a estas questões, tendo sido nosso desejo, nesta pequena e modesta exposição, recordar algumas noções, porventura esquecidas, e chamar a atenção para as bases elementares de um aspecto químico-biológico da maior actualidade.



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

ALGUMAS REACÇÕES DE OXIDAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA (*)

ANDRÉ DA SILVA CAMPOS NEVES

Prof. Ext. da Escola de Farmácia de Coimbra

Sob um tema tão geral como o enunciado, pretendo falar hoje para V. Excelências no uso de um certo número de oxidantes que, na época actual, gozam de grande prestígio, graças à comodidade do seu uso, ao rendimento que em geral originam nas reacções em que intervêm e ao limitado número de reacções secundárias a que dão lugar.

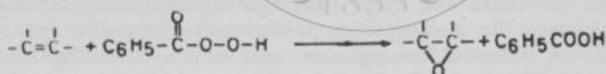
Constituirá, assim, tema principal desta conversa o emprego de perácidos, ou melhor, peroxiácidos, em Química Orgânica.

Como se sabe, peroxiácidos são compostos ácidos caracterizados pela existência na sua molécula do agrupamento -O-O-H ligado a um acilo R-C=O.

Os perácidos mais correntemente usados são os ácidos peracético, perfórmico, perbenzóico, monoperftálico, percanfórico e pertrifluoracético.

São de particular interesse as reacções que reagentes deste tipo originam, quer com compostos olefínicos, quer com compostos carbonílicos.

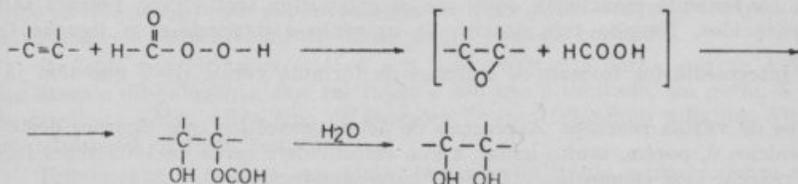
A primeira destas reacções — com compostos olefínicos —, parece ter sido praticada pela primeira vez pelo químico russo PRILESCHAJEW por volta de 1910, o que o levou a constatar que o ácido perbenzóico constituía um eficiente meio de epoxidação de ligações duplas isoladas.



A reacção decorre usualmente em condições suaves e é, em geral, levada a cabo em solventes orgânicos não reactivos (clorofórmio, éter, benzeno, acetona, dioxano, etc.).

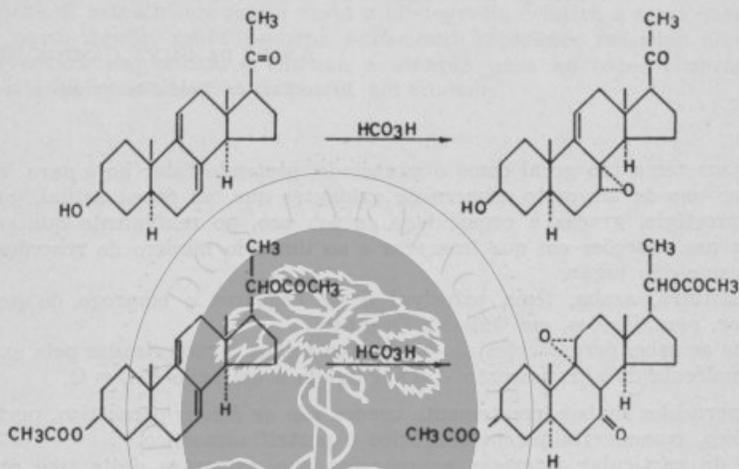
De acordo com o peroxiácido usado e com as condições da reacção, podem resultar oxiranos ou α -glicóis (estes em geral sob a forma de monoésteres), em qualquer dos casos com usual bom rendimento.

O próprio oxirano pode, depois de isolado (ou até mesmo directamente, como veremos), ser submetido a hidrólise por forma a fornecer o α -glicol.



O ácido perfórmico não é, em geral, considerado um agente epoxidante, uma vez que o seu uso leva, quase sempre, à formação de glicóis, dada a acidez que caracteriza o ácido fórmico, usado como solvente, ou formado na própria reacção.

No entanto, casos há em que, pelo emprego deste perácido, foi possível isolar epóxidos. Tal sucedeu com os oxiranos correspondentes aos oleatos de metilo e de etilo, ao dioleato de propilenoglicol e até com os esteróides alopregna-7,9(11)-dieno-3 β -ol-20-ona e alopregna-7,9(11)-dieno-3 β , 20 β -diol-diacetato, à custa dos quais DJERASSI e cols. conseguiram preparar os óxidos alopregna-7 α , 8 α -óxido-9(11)-eno-3 β -ol-20-ona e o alopregna-9 α ,11 α -óxido-3 β -20 β -diacetoxi-7-ona, por reacção com aquele perácido.



O ácido peracético é talvez o perácido mais usado na preparação de alfa-glicóis a partir de compostos insaturados. Em condições convenientes este ácido pode originar oxiranos com apreciável rendimento; porém, no método geralmente seguido, em que se usam tempos longos de reacção, temperaturas mais ou menos elevadas, ou na presença de ácido sulfúrico, isolam-se apenas alfa-hidróxi-acetatos, que resultam da abertura do anel epóxido inicialmente formado, pelo ácido acético.

A obtenção de oxiranos consegue-se, com efeito, com facilidade, se se usa o perácido em solução num solvente inerte, o que é pouco conveniente, uma vez que ele se preparara com toda a facilidade sobretudo em solução em ácido acético, e a eliminação total ou quase total do ácido acético é demorada, e até perigosa. De resto, para se conseguirem bons rendimentos em oxirano à custa deste reagente é necessário operar a temperaturas que não ultrapassem 20-25°, tornar o tempo de reacção tão curto quanto possível e evitar o emprego de ácidos fortes como o sulfúrico e o clorídrico, os quais catalisariam a reacção de abertura do anel epóxido.

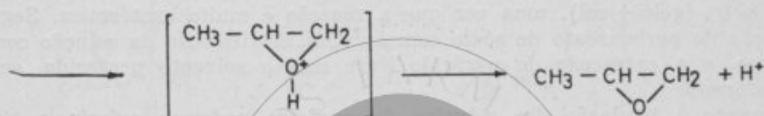
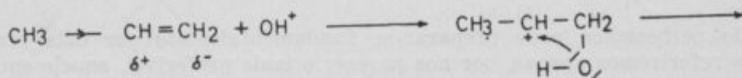
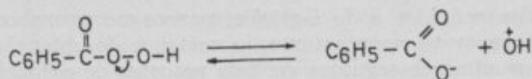
Trabalhando em semelhantes condições, não se torna necessário o isolamento do perácido, mas o rendimento em oxirano é sempre inferior ao que se consegue quando se usa o ácido perbenzóico ou o monoperftálico.

É conveniente mencionar aqui que os compostos acetilénicos reagem também com perácidos, fixando três átomos de oxigénio e partindo-se a ligação tripla.

Como intermediários formam-se oxirenos de fórmula geral: $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$ que têm já sido

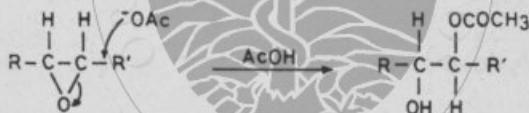
isolados de várias reacções. A reacção do ácido peracético com ligações deste tipo, acetilénicas, é, porém, muito lenta: a sua velocidade é cerca de 1000 vezes inferior à da reacção dos compostos etilénicos correspondentes.

A fase inicial da reacção de perácidos com olefinas, consiste sempre na formação do oxirano correspondente, formação esta que ocorre de acordo com o mecanismo que a seguir se representa. Só depois o oxirano é aberto para formar o hidroxí-ester:



De acordo com o que se admitia, está hoje cabalmente demonstrado que a reacção ocorre por adição *cis* à dupla ligação.

Por outro lado, a abertura do anel oxirânico, por reagentes que levem à produção de alfa-glicol, é acompanhada de inversão, quer a reacção se conduza em meio ácido, quer em meio neutro, quer ainda em meio alcalino.



Também a hidroxilação de olefinas com permanganato, tetróxido de ósmio e peróxido de hidrogénio prossegue por adição *cis*. No entanto, a hidroxilação catalítica de olefinas com o mesmo peróxido de hidrogénio e catalizadores inorgânicos tais como o ácido pertungstico, pervanádico ou dióxido de selénio, ocorre por adição *trans*.

Nas reacções que temos vindo a referir poderemos ainda citar o uso de outros perácidos, tais como o ácido monoperftálico que, contudo, tem sido menos usado que o ácido perbenzóico na preparação de epóxidos, por na maioria dos casos não oferecer vantagens sobre este, sobretudo quando se pretendem obter α -glicóis. No entanto, produz oxiranos, em geral com bom rendimento, e quando se usa em solução clorofórmica, na qual o ácido ftálico é insolúvel, este precipita à medida que se vai formando. Também oferece sobre os perácidos de fácil decomposição como o benzóico, a vantagem de poder ser usado em reacções mais longas (tais como as que se dão com duplas ligações de mais difícil ataque), uma vez que a sua estabilidade é apreciavelmente maior que a daquele perácido.

O ácido pertrifluoroacético é um ácido bastante forte, graças à influência dos átomos de halogénio. Por tal razão o seu uso é limitado, em geral, à formação de glicóis, e a um outro tipo de reacções de que falaremos adiante. Aliás, a sua estabilidade é também pequena.

Finalmente, o ácido percanfórico tem sido já usado, embora pouco extensivamente, na epoxidação de alguns compostos orgânicos insaturados, tais como o pineno e o colesterol.

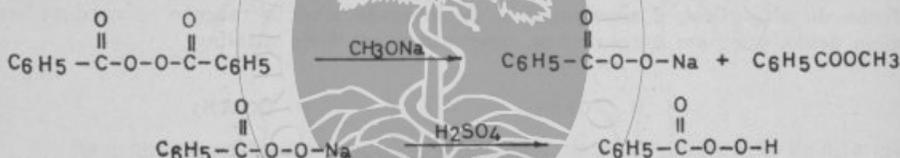
Uma vez que estamos passando em revista os perácidos mais usuais, e referidas, embora sumariamente, as condições de utilização dos diferentes perácidos

para a preparação de epóxidos e de α -glicóis, parece-me agora conveniente que, antes de mais, cite, em breve apontamento, os métodos de obtenção de tais perácidos e as técnicas usualmente seguidas em tais reacções de oxidação.

Os diferentes perácidos preparam-se por via de regra por acção do peróxido de hidrogénio a 25-90 %, sobre o ácido (caso do perfórmico e monoperftálico) ou anidrido respectivo (caso do peracético e pertrifluoracético). No caso, porém, do monoperftálico, usa-se o peróxido de hidrogénio alcalino (soda a 40 %). As temperaturas regulam entre 0° para o ácido pertrifluoroacético, até 40° para o peracético.

O ácido perbenzóico pode preparar-se fundamentalmente por dois processos, dos quais referiremos apenas, por nos parecer o mais preferível, aquele em que se faz reagir o peróxido de benzoilo em solução clorofórmica, com metilóxido de sódio em metanol, realizando-se a adição do primeiro ao segundo a temperaturas inferiores a 0° (gelo + sal), uma vez que a reacção é muito exotérmica. Segue-se a extracção do perbenzoato de sódio com água, a acidificação da solução com ácido sulfúrico, e a extracção do perácido livre com o solvente preferido, em geral o clorofórmio.

Quanto à titulação das soluções de perácido podemos referir, a título de exemplo, o que se passa com o ácido peracético: um pequeno volume, rigorosamente medido, de solução de ácido peracético (0,2-2 ml) é pipetado para 50 ml de ácido sulfúrico 4N, arrefecido a 0°. Titula-se com KMnO_4 , 0,1N até cor levemente aver-



melhada. (1 ml de KMnO_4 , 0,1 N = 0,0017 g de O_2). Junta-se, seguidamente, solução saturada de iodeto de potássio em excesso, e titula-se o iodo libertado, pelo $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 N (no caso do ácido peracético 1 ml = 0,0038 g deste perácido).

A reacção entre compostos etilénicos e perácidos pode realizar-se a frio (0 graus, ou menos em certos casos) ou por vezes a quente, tal como sucede na epoxidacção do colesterol pelo ácido monoperftálico em solução etérea, que se conduz à ebulição da solução, durante 6 horas, para se obter uma mistura de β - e α -oxiranos.

É frequente usar-se na reacção um excesso de perácido de cerca de 10 %, porém, no caso atrás referido, empregam-se em geral duas moles de perácido. O tempo da reacção é variável para cada caso, podendo seguir-se o decurso da mesma por titulação de partes alíquotas.

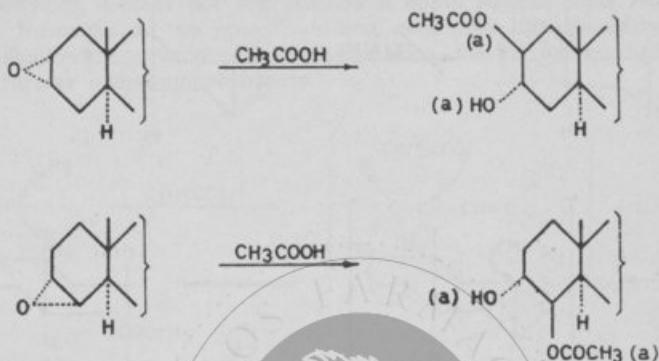
Até aqui referimos processos que nos permitem obter quer epóxidos quer α -glicóis. Deve, porém, mencionar-se agora, que o epóxido, uma vez formado, pode constituir um importante precursor da síntese de outros produtos, ou constituir, por formação do glicol correspondente, o ponto de partida para a rotura de cadeias carbonadas, quer cíclicas quer acíclicas.

A grande reactividade química dos epóxidos comparada com os éteres vulgares resulta do facto de o anel oxirano estar sujeito a grande tensão.

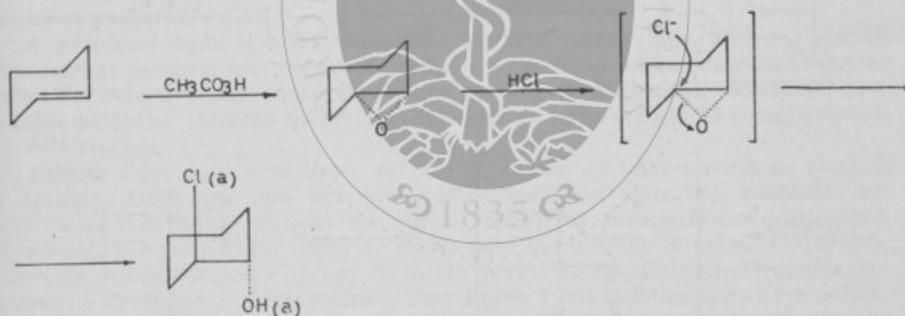
Entre as reacções a que pode dar lugar referiremos muito brevemente as que se nos afiguram mais importantes:

1) Como já foi mencionado, usando um perácido que origine um ácido suficientemente forte, ou um ácido mais fraco mas em presença de diminutas quantidades de ácido forte, como o sulfúrico ou clorídrico, que servirão de catalisadores, forma-se o monoéster do glicol. É o que sucede com os ácidos perfórmico e peracético, geralmente. Já vimos que a reacção de abertura do anel epóxido

é acompanhada de inversão, no caso geral. Com compostos alicíclicos hexagonais, tais como esteróides, diterpenos cíclicos, triterpenos, etc., a abertura de semelhantes epóxidos pelos reagentes nucleofílicos usuais é *trans-diaxial*. Assim, por exemplo:

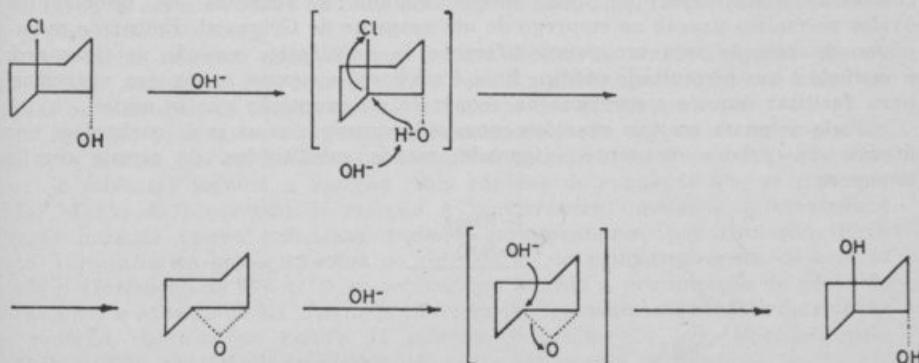


2) A adição de um ácido halogenado ao epóxido resulta na formação de uma halodrina, sendo ainda a abertura *trans-diaxial*.

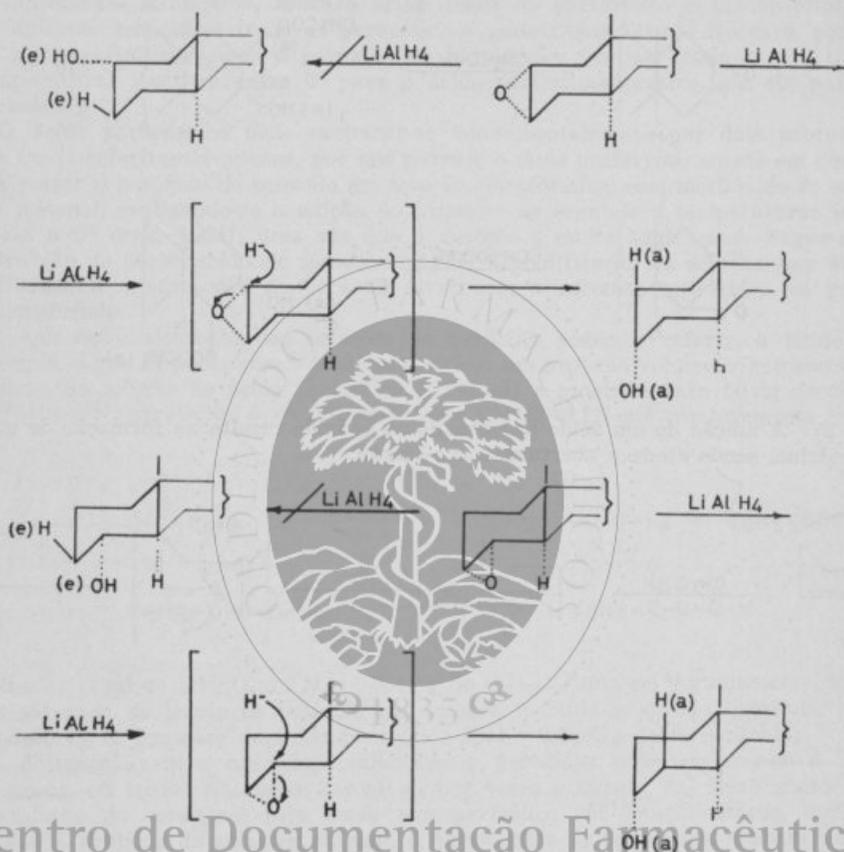


Centro de Documentação Farmacêutica

É curioso verificar-se que esta *trans*-ciclohexenocloridrina quando tratada por base forte produz o epóxido inicial, numa primeira fase, já que numa segunda fase pode resultar o *trans*-glicol.



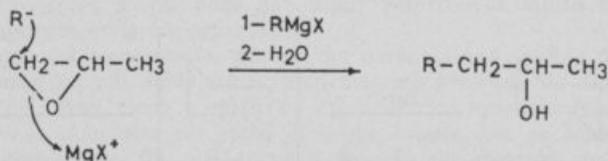
3) Outro interessante processo de abertura do anel oxirânico consiste na reacção com hidreto de lítio e alumínio. Também aqui o ataque do hidretião ocorrerá por forma tal que o hidróxilo resultante seja axial.



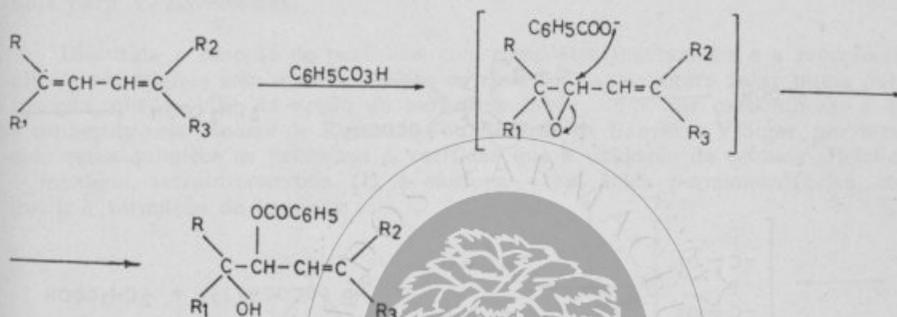
Centro de Documentação Farmacêutica

Em qualquer dos dois exemplos, se o ataque do hidretião ocorrer no átomo de carbono C_2 , obter-se-ia o hidróxilo α em C_2 , no primeiro caso, ou também α , em C_1 , no segundo caso, sendo em qualquer deles equatorial, o que não acontece. Interessa ainda referir o que sucede quando a abertura de semelhantes óxidos se realiza graças ao emprego de um reagente de Grignard. Embora o mecanismo da reacção seja um pouco diferente do da clássica reacção de Grignard, a verdade é que o resultado prático final é em geral o mesmo, e, por isso, usaremos, para facilitar, aquele mecanismo na sequência da exposição que se segue.

Tudo se passa em tais reacções como se ocorressem ataques de carbaníons nos átomos de carbono da ponte oxigenada, menos substituídos, de acordo com o esquema:



Vimos atrás que o ácido benzóico não é, em geral, capaz de, só por si, promover a abertura de um anel epóxido, para formar o α -glicol-monobenzoato. No entanto, no caso dos dienos conjugados, as coisas passam-se já de outro modo e a verdade é que, ao realizar-se a epoxidação de um tal sistema conjugado à custa do ácido perbenzóico, começa por ser atacada a dupla ligação mais reactiva, do que resulta a formação de um epóxido alílico, com uma ligação activada e tal sistema é já facilmente clivado pelo ácido benzóico, mesmo em condições muito suaves, para formar o diol-monobenzoato.



Vimos já que, por meio de reacções de perácidos com compostos olefínicos, é possível preparar α -dióis.

A propósito deste tipo de compostos, desejava referir hoje, ainda, o grande interesse que possuem tais compostos, como meio de levar à cisão de cadeias carbonadas. Tal objectivo pode conseguir-se, com apreciável rendimento, recorrendo quer ao ácido periódico (reacção de Malaprade) quer ao tetra-acetato de chumbo (reacção de Criegee).

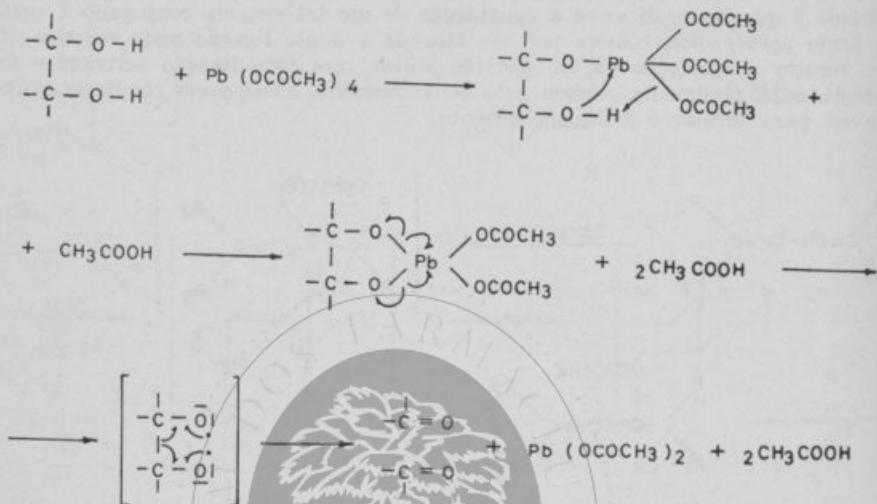
Apenas farei aqui uma breve referência ao uso do tetra-acetato de chumbo em Química Orgânica, uma vez que o ácido periódico, mais bem conhecido em geral, tem constituído objecto de várias descrições monográficas exaustivas. Citarei até, por me parecer digna de realce para quem tenha interesse no assunto, a revisão cuidadosa sobre o uso do ácido periódico em Química Orgânica, da autoria do Professor P. MALLANGEAU, Fac. Farm. Paris, publicada no livro «*Mises au point de chimie analytique pur et appliquée et d'analyse bromatologique*» publicação da Livraria Masson, orientada por Gautier.

O tetra-acetato de chumbo é um reagente muito interessante que se prepara com facilidade, dissolvendo com agitação, a 55-60°, minio ou zarcão (O_2 , Pb_2 ou chumbo vermelho) em ácido acético-anidrido acético). O produto final da reacção deixa cristalizar lindas agulhas incolores que se recristalizam de ácido acético e que terão de ser guardadas na total ausência de humidade, já que esta o converte em peróxido de chumbo.

Das várias reacções possíveis com o tetra-acetato de chumbo, a mais específica é, sem dúvida, a que ocorre a frio com 1,2-glicóis para originar aldeídos, cetonas ou misturas, de acordo com as estruturas dos glicóis em causa.

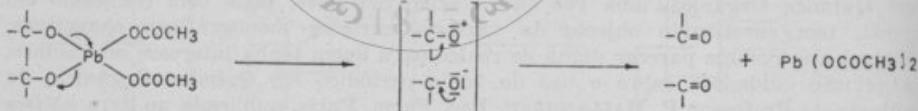
A reacção pratica-se, em geral, adicionando solução acética do tetra-acetato à solução acética (ou em benzeno ou em solventes hidroxilados anidros; estes dois tipos de solventes tornam a reacção mais rápida) do composto que se pretende oxidar. Deixa-se prosseguir a reacção à temperatura desejada, (normalmente a frio) durante tempo suficiente, podendo acompanhar-se por titulação. Para tanto, vertem-se em balão de rolha de vidro 20 ml de solução saturada de acetato de sódio (formação de $\text{Pb}(\text{AcO})_4$, solúvel que impede a precipitação de peróxido de chumbo) e excesso de KI. Junta-se um volume rigorosamente medido da solução em reacção, deixa-se no escuro 15 minutos e titula-se o iodo libertado pelo $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 N, praticando-se simultaneamente um ensaio em branco.

Quanto ao mecanismo da reacção, admite-se a formação de um composto cíclico intermediário em que entra o chumbo:



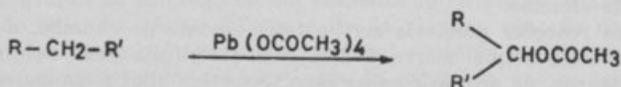
Que se forma o composto cíclico com o chumbo, parece demonstrá-lo o facto de os glicóis *cis* reagirem muito mais rapidamente que os *trans*.

Crieger propõe outro mecanismo, que parece muito mais aceitável, para a abertura do composto cíclico intermediário, e que envolve a formação de um estado de transição em que existem simultaneamente átomos de oxigénio carregados positiva e negativamente:

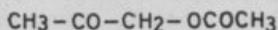


É curioso verificar-se que este processo de fissão de glicóis pode ser estendido a compostos dos tipos: α -diaminas, α -hidroxiaminas, α -hidroxiácidos, α -cetoácidos e α -hidroxicetonas.

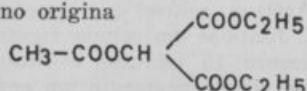
Podem estes reagentes dar ainda lugar a reacções de outros tipos. Assim, actuando sobre metilenos reactivos, ocorrerá a reacção:



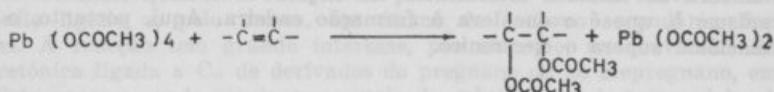
A cetona ordinária dá, de acordo com o esquema acima representado, o produto



E o malonato de etileno origina

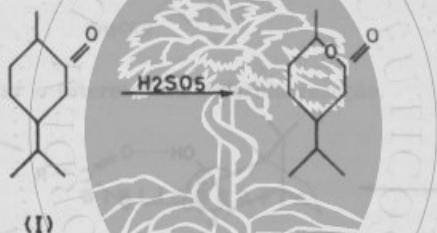


Por outro lado, o mesmo reagente actuando sobre duplas ligações, pode originar, de acordo com o esquema que se segue, diacetatos de α -glicóis:

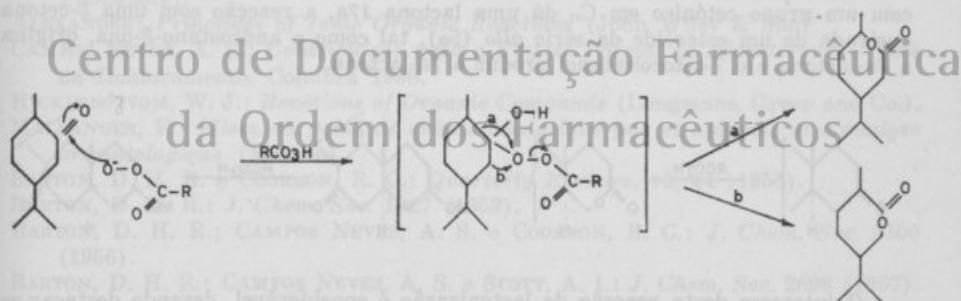


Tais reacções, porém, estão fora do âmbito da palestra que me propus realizar hoje para V. Excelências.

Discutida a reacção de perácidos com compostos insaturados e a reacção dos glicóis resultantes com o tetra-acetato de chumbo, vamos agora falar numa outra reacção, que resulta da acção de perácidos sobre compostos carbonílicos, e que é conhecida com o nome de Rearranjo ou Reacção de Baeyer e Villiger, por terem sido estes químicos os primeiros a verificar que a oxidação de cetonas alicíclicas — mentona, tetraidrocarvona (I) e cânfora — com ácido permonosulfúrico, conduzia à formação de lactonas.

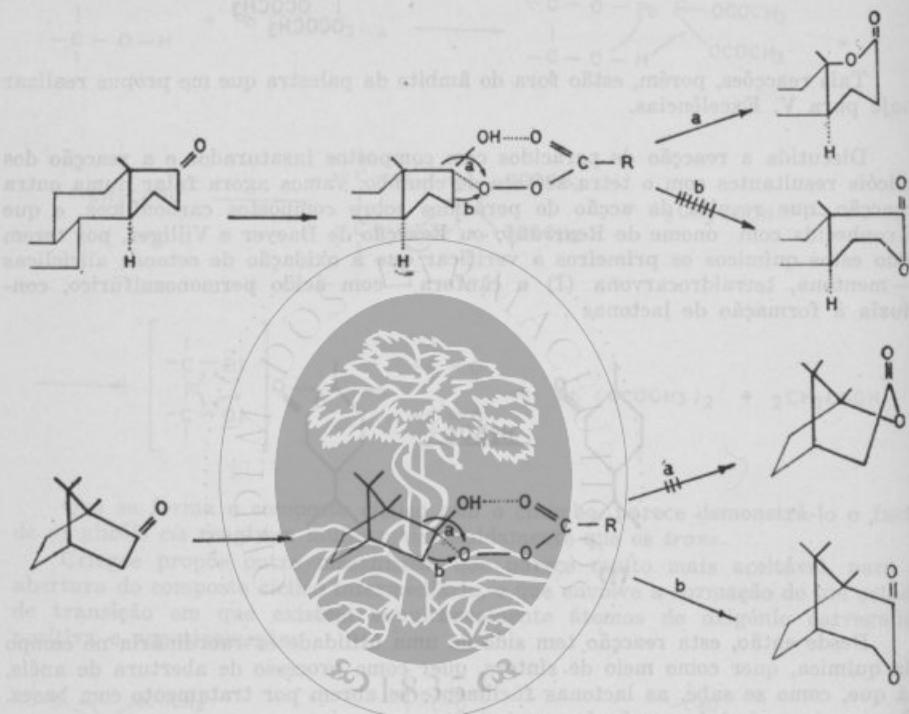


Desde então, esta reacção tem sido de uma utilidade extraordinária no campo da química, quer como meio de síntese, quer como processo de abertura de anéis, já que, como se sabe, as lactonas facilmente se abrem por tratamento com bases. O mecanismo de tal reacção é o que se segue:

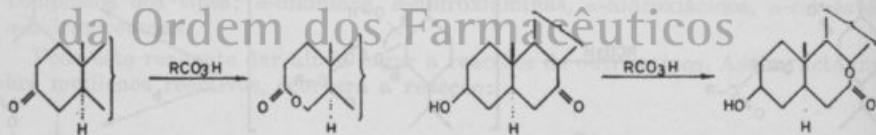


Dos dois caminhos, *a* e *b*, para a formação, respectivamente, das lactonas *a* e *b*, o primeiro é o favorecido no caso da tetraidrocarvona. O mesmo sucede, por exemplo, na lactonização do anel D de esteróides contendo um grupo $>\text{C}=\text{O}$ em C_{17} e fusão C/D trans, tal como o 3 β -acetoxi-11, 17-dioxoandrostanos. O facto resulta assim por virtude de tanto o factor electrónico como o factor conformacional favorecerem o estabelecimento da ligação C-O entre o átomo de carbono mais substituído e o oxigénio lactónico. Na verdade, quanto ao ponto de vista electrónico, é sempre favorecido o estabelecimento de uma ligação a partir do átomo de carbono adjacente mais substituído; contudo, sob o ponto de vista confor-

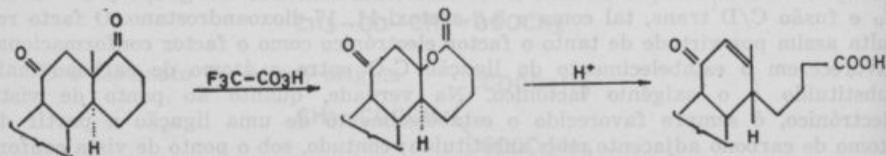
macional é preferida a ligação que permita que o estado de transição, e portanto o anel lactónico uma vez formado, possuam a conformação cadeira. Na cânfora, muito embora os factores electrónicos favoreçam o mecanismo *a*, ocorre antes o mecanismo *b*, que é o que leva à formação cadeira. Aqui, portanto, o factor conformacional supera o electrónico.



É interessante saber-se que, enquanto a oxidação de um composto esteróidico com um grupo cetónico em C_{11} dá uma lactona 17a, a reacção com uma 3-cetona derivada de um esteróide da série *allo*, (5a), tal como o androstano-3-ona, origina a 3a-lactona e o 7-cetocolesterol produz a 7a-lactona.

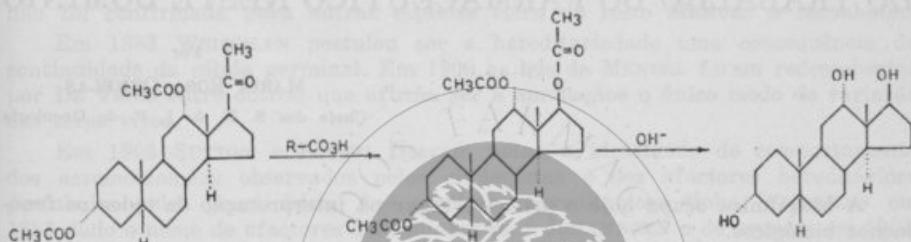


O interesse desta reacção de lactonização é considerável, devendo destacar-se a sua utilidade na abertura de anéis. A ela se recorreu, por exemplo, numa tentativa de introdução de oxigénio num grupo metilo angular esteróidico, para o que foi necessário activar tal grupo $-CH_3$.



Uma variante desta reacção ocorre com cadeias alifáticas metil-cetónicas, ou melhor, alquilcetónicas.

Na verdade, quando a reacção se pratica com cetonas contendo um grupo carbonilo ligado a, pelo menos, um átomo de carbono secundário, formam-se ésteres. A reacção tem grande interesse, por exemplo, na conversão da cadeia metilcetónica ligada a C₁₇ de derivados do pregnano ou do alopregnano, em acetatos. Este processo pode servir como meio de substituição de tais cadeias laterais, por oxidrilos, passando-se, no caso dos exemplos anteriores, das séries do pregnano à do aetiocolano, e da do alopregnano à do androstano. Um exemplo concreto é o que se representa seguidamente:



e que serve para ilustrar o interesse da referida reacção.

BIBLIOGRAFIA

- SWERN, D.: *Organic Reactions* (ed. Roger Adams et al.) — vol. III (John Wiley & Son).
- HASSAL, C. H.: *Organic Reactions* (Ed. Roger Adams et al.) vol. IX (John Wiley & Son).
- WILLIAM A. WATERS A.: *Organic Chem.*, de GILMAN, vol. IV, (John Wiley & Son).
- CRIGEE, R.: *Newer Methods of Preparative Organic Chemistry* (Interscience Publishers).
- ALEXANDER: *Principles of Ionic Organic Reactions* (John Wiley & Son).
- CAMPOS NEVES, A. S.: *Contribuição para a Síntese Parcial da Aldosterona* — Tese de Doutoramento, Coimbra 1958.
- HICKINBOTTOM, W. J.: *Reactions of Organic Compounds* (Longmans, Green and Co.).
- MALLANGER, P.: *Mises au point de chimie analytique pur et appliquée et d'analyse bromatologique* (Masson).
- BARTON, D. H. R. e COOKSON, R. C.: *Quarterly Reviews*, 10, 44 (1956).
- BARTON, D. H. R.: *J. Chem. Soc.* 1027 (1953).
- BARTON, D. H. R.; CAMPOS NEVES, A. S. e COOKSON, R. C.: *J. Chem. Soc.* 3500 (1956).
- BARTON, D. H. R.; CAMPOS NEVES, A. S. e SCOTT, A. I.: *J. Chem. Soc.* 2698 (1957).

IV SECÇÃO

BIOQUÍMICA CONTEMPORÂNEA — PERSPECTIVAS DO TRABALHO DO FARMACÊUTICO NESTE DOMÍNIO

Por

MARIA ROSA ORNELAS

Chefe dos S. F. do I. P. de Oncologia

A bioquímica ocupa hoje o primeiro lugar na interpretação de todos os fenómenos biológicos.

Saída da fisiologia e da química orgânica o seu domínio estendeu-se em seguida ao desenvolvimento da análise química e das investigações físicas estreitamente ligadas à química.

A ciência da química da vida — a bioquímica — tomou forma na primeira metade do nosso século.

Quando WÖHLER em 1828 fez a síntese da ureia não sintetizou um produto essencial como tinha pensado, mas um produto de degradação de outro mais complexo contendo azoto. Somente em 1897 BUCKNER fez a descoberta da fermentação do açúcar por um produto obtido por expressão da levedura e na ausência de células. A importância desta descoberta, como assinala BERNAL (1954), reside no facto de representar a primeira interpretação da natureza química do processo metabólico. Se quisermos atribuir uma data ao nascimento da bioquímica será, no seu entender, a de 1897.

A relação entre a matéria viva e inerte tinha tomado forma como HAECKEL que postulou em 1868 que «uma massa de proteína homogénea, sem estrutura e amorfa» (MONERA), seria a primitiva forma de substância organizada. IVANOVSKY descobre em 1892 o vírus do mosaico do tabaco, que STANLEY isola em 1935 e que confirma, em certa medida, a hipótese de HAECKEL.

A formulação da teoria celular que SCHWAN em 1838 teve o mérito de estabelecer de forma definitiva, foi de extraordinária importância para a investigação biológica. MARC KLEIN (1936) faz-nos notar que é no capítulo que SCHWAN escreveu para o Manual de Fisiologia de WAGNER, que a teoria se encontra melhor concretizada: «Na base de todos os tecidos orgânicos embora diferentes, escreve SCHWAN, encontra-se um princípio de desenvolvimento comum — a formação celular—. (...) Ela é a formação-mãe de onde derivam todos os outros elementos anatómicos».

A descendência de uma célula a partir de uma célula pré-existente com excepção de qualquer outro modo de reprodução e que está bem codificada no tratado de VIRCHOW, contribuiu em definitivo para o triunfo da teoria celular. Foi num artigo publicado em 1855 e intitulado «Patologia Celular» que VIRCHOW nos fez conhecer o seu aforismo: «eu formulo simplesmente a doutrina da geração patológica da neoplasia no sentido da patologia celular: *omnis cellula a cellula*».

Os trabalhos de VIRCHOW e dos seus alunos são o ponto de partida para uma série de trabalhos no domínio do crescimento de novas formações, do envelhecimento das células e da sua morte e da cultura de tecidos. Estabeleceram em definitivo o papel da célula no processo fisiológico e patológico.

As diferentes investigações começaram a fazer a convergência em volta da teoria celular, da hereditariedade e da evolução. Mas esta convergência não foi mais que aparente naquele momento.

As obras de LAMARCK sobre o papel dirigente das condições de vida na variabilidade hereditária e na consequente evolução, ficaram na sombra. Em 1859 aparece a grande obra de DARWIN sobre a origem das espécies e que representa o grande impulso dado à teoria da evolução sobre a variabilidade, a hereditariedade, a selecção e a adaptação. Em 1866 MENDEL estuda matematicamente a descendência ao longo de várias gerações. Conclui da sua análise que os caracteres são determinados por «factores hereditários» que ficam invariáveis e cuja descendência se efectua segundo uma lei de probabilidades, isto é, ao acaso. Esta lei não foi confirmada para outras espécies como de resto MENDEL o reconheceu.

Em 1883 WEISSMAN postulou ser a hereditariedade uma consequência da continuidade da célula germinal. Em 1900 as leis de MENDEL foram redescobertas por DE VRIES entre outros, que afirma ser a «mutação» o único modo de variação dos seres vivos.

Em 1903 SUTTON e BOVERI fizeram notar a identidade de comportamento dos «cromossomas» observados pelos citologistas e dos «factores hereditários» postulados pelos geneticistas. Aos «factores hereditários» tinha WEISSMAN em 1883 dado o nome de «factores determinantes» e JOHANNSEN o de «genes» em 1902.

A teoria do «gene» ocupou desde então um lugar central na genética. A noção de «gene» que tinha sido introduzida por JOHANNSEN como unidade abstracta para diferenciar os genótipos, transformou-se posteriormente em categorias de unidades concretas. MORGAN (1919) e seus colaboradores desenvolveram esta teoria a partir de 1910. Imaginaram os «genes dispostos regularmente ao longo dos cromossomas como se fossem contas de um rosário, numa ordem constante e definida» (DE ROBERTIS, 1960).

A influência da teoria morganista da hereditariedade fez-se sentir sobre os trabalhos da citologia e da genética e também sobre os da bioquímica que nesta altura não podia dar uma explicação consequente dos factos encontrados.

A teoria cromossómica deu lugar à hipótese do gene-molécula de nucleoproteína e esta à da molécula de ADN no papel de substância hereditária, a única reconhecida como susceptível não só de transmitir os caracteres hereditários mas também de introduzir qualquer alteração de caracteres em todas as reacções de transformação e de adaptação.

A bioquímica contemporânea chama a nossa atenção para esta generalização inconsequente.

A hereditariedade não é uma substância mas uma propriedade de tudo o que vive. Não se trata do aspecto macroscópico, global, desta propriedade biológica quando considera o corpo vivo como uma entidade, assim como não se trata da cadeia evolutiva dos seus antecessores. Trata-se sim do «mecanismo» interior da acção e da realização desta propriedade graças aos componentes dos seres vivos capazes, em seguida às suas ligações recíprocas e da sua estrutura original de realizar a acumulação, a conservação e a transmissão dos traços hereditários dos pais aos filhos, da célula-mãe à célula-filha, como elementos originais. Trata-se portanto de delinear o quadro preciso dum certo fenómeno biológico condicionado pela relação intra e entre moléculas no interior da célula e das suas formações particulares, o núcleo e o citoplasma (KEDROV, 1962).

Naturalmente que a tentativa para elucidar o problema da origem da vida, da evolução, da hereditariedade ou ainda da divisão celular no desenvolvimento embrionário, no crescimento, na regeneração, no envelhecimento e morte das células ou ainda nos estados patológicos e em particular o cancro, não pode limitar-se a conclusões restritas. Nunca chegará a uma solução completa se não se fundar na síntese dos dados fornecidos pelos diferentes ramos da biologia.

A aplicação directa dum método de investigação histórico-comparativo (GOLDOVSKI, 1960) é de extrema importância para a investigação bioquímica.

Sob o ponto de vista comparativo permite estudar a inter-relação de todos os escalões no processo de troca de substâncias que caracteriza o fenómeno da vida.

Compreende também o estudo das transformações sofridas ao longo do processo da evolução. Mas porque é difícil tirar conclusões sobre os fósseis, o estudo das características dos processos de decomposição dos organismos nas diferentes épocas geológicas, na medida em que estes processos estão ligados à actividade de outros organismos vivos, traz um auxílio incomparável à paleontologia que assim aparece ligada à biogeoquímica e à geoquímica.

A bioquímica comparada que no estudo da evolução não tomou ainda forma, tem uma importância extraordinária na investigação conduzida com outro fim.

Permite estudar sob o ponto de vista comparativo a diferentes níveis: 1) a composição química geral dos organismos, a existência de determinados grupos de substâncias e as suas relações quantitativas; 2) a estrutura química das substâncias de diversos grupos nos diferentes organismos: traços gerais e diferenças de estrutura das proteínas (FOX et al., 1955; DEBORIN, 1960), dos ácidos nucleicos (CHARGAFF, 1955; CHEPINOGA, 1962; HAGEBOOM, 1955), dos lípidos (DERVICHIAN, 1949), etc.; 3) diversos processos bioquímicos que se encontram na base das funções fisiológicas (actividade nervosa, movimento, vista, bioluminescência, função tiroidiana); 4) os sistemas enzimáticos que determinam o curso dos diversos processos bioquímicos (BALDWIN, 1957; NOVIKOFF, 1960).

Quando o morfologista tem de parar por não encontrar órgãos homólogos ou análogos, o bioquímico pode prosseguir as suas experiências que se fundam na comparação de substâncias, dos processos bioquímicos e dos sistemas enzimáticos que são a base das funções fisiológicas.

Vários trabalhos de bioquímica comparada provam a evolução dos organismos a partir de uma origem comum. Por exemplo, a existência de proteínas contractíeis provenientes não só dos músculos de diversos animais mas também a partir de outros organismos possuindo os mesmos caracteres enzimáticos (actividade ATP-ásica); outros trabalhos mostram que um só e mesmo sistema (acetilcolina-colinesterase) desempenha um papel importante na actividade eléctrica e excitabilidade, não-somente do sistema nervoso animal mas também nos organismos onde a diferenciação nervosa não se efectuou (excitação eléctrica que caracteriza a paramécia) (HARVEY, 1953).

Admite-se que os mecanismos bioquímicos de base se formaram ao longo do processo de elaboração dos organismos primitivos e da sua transformação em organismos monocelulares simples. As funções vitais nestes organismos limitavam-se a simples relações com o meio exterior. Ao longo do desenvolvimento dos organismos pluricelulares criou-se um meio interno assegurando às células condições às quais se tinham adaptado. Um órgão dado não podia aparecer e aperfeiçoar-se sem participar do desenvolvimento evolutivo do organismo no seu conjunto.

A diversidade dos caracteres bioquímicos e também morfológicos na «hierarquia» das subdivisões sistemáticas, mostram o desenvolvimento contínuo por adaptação directa ao meio ambiente por transformação dos seus mecanismos bioquímicos (GOLDOVSKI, 1960).

A natureza destes mecanismos na transmissão dos caracteres hereditários ou da transmissão da «informação genética», isto é, da transmissão dos sistemas multimoleculares que asseguram a permanência desses caracteres, é hoje objecto dum estudo exaustivo.

Não abrange apenas o domínio do normal mas cofirma a doutrina da geração patológica que VIRCHOW soube formular.

Os fenómenos químicos de troca de substâncias efectuam-se no sistema vivo no seio dum substrato heterogéneo de diferentes fases, duma extrema complexidade

e que conserva esta característica até à escala molecular. Esta escala menor inclui numa primeira fase a agregação de simples átomos e numa segunda fase a formação de polímeros (BERNAL, 1960).

Nestes sistemas os processos químicos não são regidos somente por leis químicas no sentido próprio do termo, pela capacidade de reacção dos compostos respectivos, pela actividade dos fermentos ou pela lei da acção das massas, mas por forças específicas que incluem não só as forças interatómicas conhecidas como ligações químicas, mas também forças fracas que operam entre os átomos como as forças de atracção de VAN DER WAALS, a atracção electrostática entre agrupamentos de sinal contrário e a formação de pontes de hidrogénio (PAULING, 1960). Estes fenómenos revelam menos da química do que da físico-química sendo por isso considerados no fundo mais sob o aspecto físico, embora as leis do metabolismo e a sua harmonia não possam ser explicadas unicamente pelas noções físicas e químicas correntes.

A física e a química da matéria viva possuem leis próprias, distintas da matéria inanimada.

Na célula viva as reacções químicas que conduzem à formação de proteínas possuem propriedades qualitativamente diferentes das produzidas por reacções químicas que se efectuam na natureza inorgânica. Além disso o carácter específico do quimismo dos seres vivos exprime-se igualmente no facto de numerosas reacções dos processos bioquímicos do metabolismo serem reversíveis embora o metabolismo biológico no seu conjunto se efectue num único sentido e seja irreversível.

As propriedades do metabolismo são sobretudo determinadas pelas propriedades mecânicas, físicas e químicas das substâncias que fazem parte da matéria viva, sendo o papel dominante atribuído às proteínas.

O sistema metabólico está dependente de catalizadores, representados essencialmente pelos fermentos, as vitaminas e as hormonas e que são de uma importância decisiva na determinação da orientação e intensidade do processo que realiza ao mesmo tempo a sua síntese. Desta maneira criou-se um sistema de fenómenos estreitamente ligados entre si que asseguram a auto-regulação e a auto-conservação, a variabilidade e o desenvolvimento da matéria viva.

Todos os processos bioquímicos conhecidos são acompanhados por efeito energético, porque toda a modificação da matéria envolve inevitavelmente uma modificação da sua reserva de energia disponível. A energética dos processos metabólicos é também diferente das reacções energéticas que se efectuam nos corpos inanimados. O primeiro aspecto da bio-energética é o da transformação directa da energia química em trabalho ou outras formas de movimento da matéria, sem transformação em energia térmica. O segundo reside no facto de a libertação de energia ao longo do processo de oxidação não se fazer de uma só vez, mas progressivamente por doses limitadas, discretas, por quanta. A terceira particularidade característica da bio-energética é a da transformação das diversas fontes de energia provenientes das reacções químicas em fontes de energia dum tipo particular, constituído por compostos fosforados e sulfurados ricos em energia (SISSAKIAN, 1959).

Segundo as concepções actuais o hidrogénio é a principal fonte de energia do metabolismo. Como escreve LABORIT (1961), «os seres altamente organizados podem ser considerados essencialmente como máquinas de ionizar as moléculas de hidrogénio», se pusermos de parte uma série de parâmetros que dizem respeito à matéria viva (acrescentamos nós).

Sabe-se com efeito, que o hidrogénio retirado a uma substância em via de oxidação, não se une imediatamente ao oxigénio, libertando toda a sua energia disponível mas atravessa uma série de transportadores intermediários. Quando perde um electrão toma a forma ionizada ligando-se enfim ao oxigénio para formar a água. Em cada estado intermediário perde uma parte da sua energia de reserva

inicial e assim a energia dos processos de oxidação se quantifica. Os fenómenos atómicos ligados à matéria viva vão apenas ao limite dos electrões planetários.

A actividade específica de tais sistemas só pode ser assegurada por uma alta precisão de auto-regulação.

Este aspecto leva a fazer uma interpretação cibernética de alguns fenómenos biológicos que julgamos de interesse esclarecer.

Embora pareça absurdo comparar as funções fisiológicas do homem ao trabalho de uma máquina cibernética, há contudo uma certa imitação do conjunto complexo dos processos biológicos e dos sistemas de *contrôle* (FRANK et al., 1959).

Todos os mecanismos do organismo humano se auto-regulam de tal maneira que o equilíbrio entre a célula e o meio extracelular, os grupos de células e tecidos entre si, conduz ao equilíbrio entre o organismo no seu todo e o meio que o envolve.

No regulador, o efeito tem um valor fixo graças ao «feed-back» (alimentação em retorno ou retro-acção) isto é, o efeito é garantido pela correcção ou ajustamento imediato das variações de todos os seus factores. Se as variações contingentes do meio são de tal ordem que alteram certos factores ou afectam o próprio «feed-back», o efeito não se produz, entrando-se no domínio da fisiopatologia.

Toda a célula viva possui, como sabemos, sistemas enzimáticos responsáveis pelo funcionamento do seu meio interno. Num sistema enzimático o enzima encontra-se idêntico a si próprio no fim da reacção desempenhando o papel de uma «informação» que «faz funcionar» o seu meio. O substracto exerce efeitos limitantes («feed-back») sobre a própria síntese. O ser vivo representando um sistema deste tipo contém uma «rede de informações» dotada de uma alta organização. A «informação» é portanto multiforme e é recebida sob a forma de um «código» (sistema de sinais simples ou sucessões de direcções).

A noção de «informação» que é fundamental em cibernética (sendo a cibernética a ciência da informação, do automatismo e do *contrôle*), entrou sem prévia explicação, no domínio da biologia e da bioquímica. De resto a palavra «hormona» ou «mensageiro químico» indica já a noção de mensagem. Interpretam-se hoje em esquemas cibernéticos, parte dos sistemas fisiológicos (LABORIT, 1961).

São milhares os processos químicos que, harmoniosamente coordenados, mantêm e renovam não-sómente os constituintes químicos complexos mas também a estrutura específica do ser vivo.

Actualmente estuda-se a morfologia bioquímica da célula e esclarece-se a topografia das funções bioquímicas no seu interior procurando desvendar o papel funcional dos seus diferentes elementos estruturais.

Somos assim levados à noção fundamental da bioquímica da correlação *estrutura-função*.

Um dos exemplos de melhor poderá ilustrar esta noção é sem dúvida o da fibra muscular. Sob o ponto de vista bioquímico a contracção flagelar é idêntica à muscular sendo ambas estimuladas ou activadas pelo ATP. Além disso, tal como no caso do músculo, a mobilidade da bactéria é inibida por inibidores portadores de agrupamentos tiol do tipo mercaptido, que produzem o bloqueio dos grupos SH presentes no flagelo (DE ROBERTIS et al., 1951). No mecanismo da contracção das fibras musculares, a contracção é devida ao deslizar das fibras de miosina e de actina alinhadas lado a lado.

Embora a estrutura e a ultra-estrutura celular pertençam à morfologia, estão intimamente ligadas à bioquímica por se tratar da morfologia dos complexos moleculares sobre os quais repousam as funções biológicas.

Depois do desenvolvimento da técnica do microscópio electrónico e do fraccionamento celular, o conhecimento da estrutura e funções celulares aumentou consideravelmente.

Muito embora a citoquímica electrónica tenha conseguido importantes progressos são as técnicas que permitem a «desintegração bioquímica celular» que mais interessam os investigadores.

Sucessos importantes foram conseguidos no estudo do papel bioquímico do núcleo, dos plastos, dos mitocondrias, dos microsomas e da parte do conteúdo celular não estruturada e isolados por este processo.

Cada formação desempenha um papel importante na vida da célula. Os co-fermentos nucleicos concentram-se no núcleo da célula, os processos de bio-síntese têm lugar nos plastos; os mitocondrias são em certa medida as centrais eléctricas da célula; aí se forma a energia necessária à manutenção das funções vitais; a síntese das proteínas efectua-se nas mais pequenas estruturas intra-celulares: os microsomas; a desintegração profunda dos hidratos de carbono na parte não estruturada da célula; os enzimas encontram-se localizados um pouco por todo o lado, segundo as suas funções específicas (NOVIKOFF, 1959).

Observando uma microfotografia obtida ao microscópio electrónico, põe-se em dúvida a aparente fragilidade destas estruturas que hoje é possível isolar praticamente isentas de contaminação. O problema mais difícil tem sido posto aos investigadores que tentam isolar as estruturas do núcleo proveniente de órgãos dos mamíferos.

O método universalmente usado para a separação das estruturas é o da ultra-centrifugação diferencial que permite a separação das fracções de acordo com o tamanho da partícula.

A centrifugação em gradiente de densidade é um processo altamente selectivo permitindo a separação das células, estruturas celulares, vírus, proteínas, lípidos ácidos nucleicos e enzimas.

Existem duas aplicações principais de gradientes: na *centrifugação por zonas*, a suspensão do material após homogeneização, é colocado à superfície dum gradiente de declive fraco. Os diferentes grupos de partículas possuindo a mesma velocidade de sedimentação, sedimentam por zonas homogéneas. Na *centrifugação isopícnica*, a centrifugação prolonga-se até que cada partícula tenha atingido um nível do gradiente correspondente à sua própria densidade (ORNELLAS, 1962).

Do estudo da estrutura-função dos componentes celulares, da actividade metabólica dos compostos isolados e da sua função específica, um papel excepcional é atribuído às proteínas. Este papel manifesta-se em primeiro lugar no facto de nenhum processo químico com uma actividade mesurável, poder efectuar-se sem o seu concurso. Por outro lado as investigações bioquímicas mostram que, paralelamente às proteínas, um papel importante é desempenhado no metabolismo pelos complexos de proteínas ligadas em primeiro lugar aos ácidos nucleicos, aos lípidos e aos polissacaridos.

As investigações mostram que todos os fermentos, os anticorpos, as toxinas, o interferon e certas hormonas são proteínas. No entanto não poderão exercer certas funções específicas sem estarem ligadas a outras substâncias a maioria das vezes de estrutura mais simples. Assim adquirem propriedades enzimáticas quando ligadas às vitaminas, ao cobre, ao cobalto, ao zinco, etc. Sabemos ainda que a imunidade é principalmente determinada pela propriedade das proteínas e de polissacaridos específicos e que ligadas aos ácidos nucleicos estão intimamente ligadas à especificidade sistemática dos organismos.

As proteínas não se tornam vírus, com funções de auto-reprodução nitidamente marcada sem estarem ligadas aos ácidos nucleicos, sob a forma de núcleo-proteínas. É preciso notar que, isoladamente, as proteínas e os ácidos nucleicos são desprovidos desta propriedade e que nem todas as núcleo-proteínas são vírus. Por outro lado as investigações dos últimos anos mostram a grande importância da proteína nas propriedades antigénicas dos vírus e ao mesmo tempo a grande importância dos ácidos nucleicos na reprodução dos fagos (ou vírus das bactérias) e dos vírus. Mas a transmissão da infecção causada pelo vírus do mosaico do tabaco, da gripe, da poliomielite, da febre aftosa, está ligada ao ácido ribonucleico (ARN), enquanto que nos fenómenos de reprodução do vírus do papiloma de SHOPE, do polioma e do bacteriófago e das transformações das bactérias, o papel

determinante recai sobre as proteínas e o ácido desoxiribonucleico (ADN) (BURNET, 1960; BURNET et STANLEY, 1959).

Nos últimos anos tem sido estudada a composição das proteínas pela ordem de sequência dos ácidos aminados (COREY et PAULING, 1953; 1955) e a composição dos ácidos nucleicos pela ordem de sequência das bases púricas e pirimídicas (CHARGAFF, 1958), determinando-se assim a sua especificidade e a sua heterogeneidade quer a partir das proteínas e dos ácidos nucleicos extraídos de diferentes órgãos do mesmo animal e de órgãos homólogos de animais de diferentes espécies, de tecidos normais e patológicos. Até há pouco supunha-se que a variação das proteínas e dos ácidos nucleicos na célula neoplásica era apenas quantitativa. Estudos recentes (BUSCH, 1962) mostraram pela primeira vez uma diferença específica nas proteínas nucleares. O fraccionamento das histonas por técnicas químicas e cromatográficas conjugadas, revelaram a existência dum segundo pico que foi codificado como RP2L. Fracções purificadas revelaram a variação dos ácidos aminados contidos nas proteínas.

Podemos concluir resumindo que na inter-acção das proteínas com outras proteínas (WAUGH, 1954), com os ácidos nucleicos (CHEPINOGA, 1962), com os polissacaridos (CARGAFF, 1958) e com os lípidos (DERVICHIAN, 1949), embora dependente da natureza química dos reactantes, o carácter das ligações pode diferir (DEBORIN, 1960). Por outro lado a natureza das forças que operam no processo de duplicação das moléculas nos organismos vivos determinam a sua especificidade biológica (PAULING, 1960; WATSON et CRICK, 1953; 1954).

O estudo da actividade biológica destas substâncias tem sido possível graças à incorporação de precursores marcados (TAYLOR, 1957) seguida de métodos citoquímicos e auto-radiográficos ou de métodos de extração selectiva dos diversos constituintes por cromatografia e electroforese e técnicas de dosagem químicas e espectrofotométricas.

A organização celular permite a protecção e a manutenção duma organização molecular complexa em perpétuo renovamento, «turnover» (troca incessante de matéria e de energia) e a organização orgânica permite a manutenção da organização celular.

Para que o trabalho metabólico seja coordenado em vista à manutenção do equilíbrio do organismo no seu meio ambiente, duas condições são necessárias: a primeira é que exista um sinergismo de acção entre todos os sistemas e a segunda que o organismo sendo uma entidade em relação ao meio exterior, coordene o funcionamento da unidade celular de maneira a assegurar a sua sobrevivência à qual estão ligadas naturalmente as células que o compõem.

Esta dupla regulação torna difícil a descrição fisiológica, porque os processos se passam ao mesmo tempo e cada célula, cada tecido, cada órgão, participa no funcionamento do conjunto.

A primitiva bioquímica foi caracterizada pelo estudo da composição química do organismo no seu conjunto, dos seus órgãos e tecidos e no sucesso obtido pelos químicos organicistas no isolamento e síntese dum certo número de substâncias importantes, embora certos aspectos do metabolismo fossem estudados separadamente como se se tratasse de fenómenos independentes. A química clínica limitou-se no seu início ao estudo da urina. Avançando mais chega à determinação dos valores normais das concentrações sanguíneas e plasmáticas (SUNDERMAN, 1950).

A bioquímica contemporânea longe de refutar a ideia de que o organismo e a células são entidades independentes, funda-se ao contrário sobre ela.

O equilíbrio ácido-base e hidro-mineral dependem essencialmente do funcionamento celular e dos emuntórios; da mesma forma a regulação da glicémia, da lipidémia, da proteinémia, dependem do aproveitamento e colocação em circulação ou reserva e da sua utilização celular.

Apercebemo-nos cada vez mais que numerosas afecções são doenças metabólicas.

Reconhece-se por outro lado que toda a terapêutica é hoje inconcebível se não é acompanhada da colaboração e garantia que lhe oferece a bioquímica clínica que permite uma visão imediata do estado do organismo num instante preciso e a interpretação dos resultados com a sua significação clínica.

A compreensão da terapêutica que pressupõe o conhecimento do funcionamento normal do organismo ou fisiologia e das perturbações trazidas pela doença ou patologia, exige já o conhecimento duma fisiologia e patologia celular (LABORIT, 1961).

Os «anabólicos» e «catabólicos», os «metabólicos» e «antimetabólicos», os «enzimas» e «antienzimas» parecem ser os grandes capítulos da farmacodinamia futura, baseada num conhecimento bioquímica cada vez mais preciso.

Quais são as possibilidades e perspectivas do investigador farmacêutico neste domínio e o reflexo na sua actividade prática?

Temos na nossa frente a mensagem do Professor Niels Bohr, prémio Nobel da Física, há pouco falecido, e que nos foi dirigida na sessão inaugural do Congresso Internacional das Ciências Farmacêuticas realizado em Copenhague em 1960.

«O programa deste Congresso», disse o Professor Niels Bohr, «é testemunho do facto que as Ciências Farmacêuticas e Farmacológicas representam uma parte integral do desvendar dos segredos da natureza, através do qual nos será possível atingir um melhor conhecimento do ser humano e contribuir para o seu bem-estar... a sua saúde.

Não desejamos fazer especulação à volta do tema desenvolvido pelo Professor Niels Bohr.

Diremos apenas que a evolução das Ciências Farmacêuticas tal como a evolução das Ciências Biológicas, depende da evolução e progresso da Bioquímica.

As perspectivas alargam-se neste domínio onde o Farmacêutico deve marcar a sua posição.

A bioquímica clínica exclui hoje a análise hematológica do domínio do citologista, e a análise bacteriológica do domínio do bacteriologista.

A tendência marcada da bioquímica clínica consiste na substituição da natureza do meio biológico pela dos metabolismos como base de classificação (DEVAUX, 1962).

Assim são explorados o metabolismo hidro-mineral, glucídico, lipídico, protídico, os biocatalizadores que compreendem a amilase, a fosfatase, a transaminase, os carotenóides, o ácido pirúvico e o ácido ascórbico, e as provas funcionais da coagulação, do fígado, do rim, do estômago, e do pâncreas.

Novos métodos para a diferenciação das lipodoses simples e lipodoses com alteração dos lípidos séricos e provas de eliminação dos lípidos pelos doentes arterioscleróticos, começam a surgir exigidos pela investigação clínica.

As técnicas de bioquímica clínica têm de aliar à especificidade e à precisão, a simplicidade e a rapidez. A sua execução exige conhecimentos profundos de química e os resultados expressos em números reduzem o diagnóstico ao valor do símbolo matemático.

Os velhos argumentos que tentam impedir ao farmacêutico português a prática de análises, perdem o seu significado dentro da evolução das análises bioquímicas. O farmacêutico deve reclamar para si a especialização, fundamentando-se na sua preparação universitária.

Por outro lado o melhor conhecimento do metabolismo celular leva ao melhor conhecimento da acção das substâncias que podem com ele interferir.

A noção de correlação estrutura-função é substituída em farmacodinamia pela noção de correlação estrutura química-actividade fisiológica (AVIADO, 1962).

Nenhuma droga tem acção limitada a uma simples estrutura morfológica. Por exemplo, a epinefrina pode influenciar directamente o tónus muscular brôn-

quico, o tónus vascular pulmonar e o fluxo sanguíneo pulmonar; a metoxamina, outra amina simpaticomimética, tem acção directa exclusiva sobre o fluxo sanguíneo pulmonar embora directamente possa influenciar a fibra lisa dos vasos bronco-pulmonares.

Será possível num futuro próximo relacionar a especificidade e não-especificidade das drogas pela sua estrutura química e pelo tipo de ligações possíveis.

A designação de «biofarmacêuticos» recentemente introduzida por GERHARD LEVY, significa o estudo da relação entre as propriedades físicas e químicas da droga e os seus efeitos biológicas.

Admite-se hoje como base experimental, que muitas das alterações patológicas são provocadas pela administração de determinadas drogas.

O problema da toxicidade aguda e crónica terá de ser desvendado ao nível da célula pelas alterações progressivas ou irreversíveis de qualquer processo metabólico ou interferência directa no metabolismo dos ácidos nucleicos e das proteínas.

Num tempo quase «recorde» surgiram técnicas bioquímicas de utilização directa no ensaio das drogas. Entre elas a que compreende o emprego de culturas de fibroblastos do embrião de pinto para o estudo da acção citotóxica de alguns medicamentos (GERMAN et al., 1961).

Vivemos ainda sobre o rescaldo do incêndio provocado pela talidomida.

Escrevemos a propósito que a ciência tem as suas lacunas e que o trágico acidente não podia ter sido previsto ou evitado. A triste experiência exige que a tragédia não volte a repetir-se.

Foi constituída a Sociedade Europeia de Farmacologia Bioquímica cuja finalidade é promover o conhecimento entre as disciplinas no campo da biologia e da medicina. «Os métodos bioquímicos», diz a circular que nos foi enviada «são extraordinariamente importantes para o estudo da acção dos medicamentos». As técnicas farmacológicas e as técnicas bioquímicas conjugam-se fazendo desaparecer as barreiras entre elas e dando lugar a uma disciplina nova: a Farmacologia Bioquímica. Sentindo a grande potencialidade deste novo campo de investigação, a Sociedade Europeia de Farmacologia Bioquímica promove a colaboração activa e os contactos pessoais entre os cientistas ou investigadores empenhados nesta tarefa.

A primeira reunião geral terá lugar em Milão, no Verão de 1964.

Que as Ciências Farmacêuticas não voltem a engendrar monstros, mas contribuam para o «desvendar das maravilhas da natureza, adquirindo um melhor conhecimento do ser humano e contribuindo para o seu bem-estar»... que é afinal o seu estado de saúde, o bem mais preciso.

da Ordem dos Farmacêuticos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVIADO, D. M. (1962): *J. Pharm. Sci.*, **3**, 191.
 BALDWIN, E (1957): *Dynamic aspects of biochemistry*, 3 ed. Cambridge University Press, London.
 BERNAL, J. D. (1954): *Science in History*, Routedledge, London.
 BERNAL, J. D. (1960) In: *Aspects of the Origin the Life* (M. Florin, ed.) Pergamon Press, London, New-York.
 BURNET, F. M. (1960): *Principles of animal virology*, 2 ed., Academic Press, New-York.
 BURNET, F. M. et STANLEY, W. M. (1959): *The viruses*, Academic Press, New-York.
 BUSCH, H. (1962): *An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell*, Academic Press, New-York.
 BUSCH, H., STARBUCK, W. C. et DAVIS, J. R. (1959): *Cancer Research*, **19**, 684.
 CHARGAFF, E. E. (1958): *Of nucleic acids and nucleoproteins*, Harvey Lect., Series 52.

- CHAUVEAU, J., MOULÉ, Y. et ROULLER, C. (1956): *Exper. Cell Res.*, **11**, 317.
- CHEPINOGA, O. P. (1962): *The biological Role of Nucleic Acids*, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- COREY, R. B. et PAULING, L. (1953): *Proc. Roy. Soc. London*, **141**, 10.
- COREY, R. B. et PAULING, L. (1955): *Rendic. Inst. Lombardo Sc. Lettre*, **89**, 10.
- DEBORIN, G. A. (1960) In: *Aspects of the Origin of the Life* (M. Florkin, ed.), Pergamon Press, London, New-York.
- DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W. et SAEZ, F. A. (1960): *General Cytology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London.
- DE ROBERTIS, E. D. P. et PELUFFO, C. A. (1951): *Proc. Exper. Biol. Med.*, **78**, 584.
- DERVICHIAN, D. F. (1949): *Discuss. Faraday Soc.*, **6**, 7.
- DEVAUX, G. (1962): *Choix de techniques de Biochimie Clinique*, Gauthier-Villars et Cie., Paris.
- FLORKIN, M. (1944): *L'évolution biochimique*, Desoer, Liège.
- FOX, S. W. et HORNEYER, P. G. (1955): *Amer. Naturalist*, **89**, 163.
- FRANK, G. et ENGELHARDT, V. (1959): *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **291**, 693.
- GERMAN, M. A., PARROUSSE-PERRIN, J. et PAUTY, A. M. (1961): *Ann. Pharm. Fran.*, **XIX**, 633.
- GOLDOVSKI, A. (1960): *Biokhimia*, **1**, 3.
- GOLDOVSKI, A. (1960): *Biokhimia*, **1**, 3.
- HARVEY, E. N. (1953): *Federat. Proc.*, **12**, 597.
- HAGEBOOM, G. H. et SCHNEIDER (1955) In: *Nucleic Acids* (Chargaff et Davidson, eds.), Academic Press, New-York.
- KEDROV, B. (1962): *La culture et la vie*, **10**, 23.
- LABORIT, H. (1961): *Physiologie Humaine Cellulaire et Organique*, Masson et Cie., eds., Paris.
- MARC KLEIN (1936): *Histoire des origines de la théorie cellulaire*, Hermann, ed., Paris.
- MORGAN, T. H. (1919): *The physical basis of heredity*, J. B. Lippincott, Co., Philadelphia.
- NOVIKOFF, A. B. (1960) In: *Developing Cell Systems and their Control* (D. Rudnick, ed.), Ronald Press, New-York.
- OPARIN, A. I. (1960) In: *Aspects of the Origin of the Life* (M. Florkin, ed.), Pergamon Press, London, New-York.
- ORNELLAS, M. R. (1962) *Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.*
- PAULING, L. (1960) In: *Aspects of the Origin of the Life* (M. Florkin, ed.), Pergamon Press, London, New-York.
- SEGAL, J. et WOLF, A. (1954-1955): *Zeitschr. d. Humb. Univ. Math. Nat. Reith.*, **4**, 235.
- SEGAL, J. et WOLF, A. (1954-1955): *Zeitschr. d. Humb. Univ. Math. Nat. Reith.*, **4**, 235.
- SISSAKIAN, N. (1959): *Voprossy filosofii*, **2**, 89.
- SISSAKIAN, N. (1959): *Voprossy filosofii*, **2**, 89.
- SUDERMAN, F. W. et BOERNER, F. (1950): *Normal Values in Clinic Medicine*, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- TAYLOR, D. (1957): *The measurement of radioisotopes*, Methnen's monographs, London.
- WALD, G. (1953): *Federat. Proc.* **12**, 606.
- WALD, G. (1953): *Federat. Proc.* **12**, 606.
- WATSON, J. D. et CRICK, F. H. C. (1953): *Nature*, London, **171**, 737.
- WATSON, J. D. et CRICK, F. H. C. (1954): *Proc. Roy. Soc.*, **223A**, 80.
- WATSON, J. D. et CRICK, F. H. C. (1954): *Proc. Roy. Soc.*, **223A**, 80.
- WAUGH, D. F. (1954): *Advanc. Protein. Chem.*, **9**, 326.
- WILKINS, M. H. F. (1957): *Biochem. Soc. Symp.*, **14**, 13.

HIDRÓLISE DOS ESTERÓIDES CONJUGADOS

ELISETT DE SÁ GONÇALVES

Analista do Instituto Maternal

Os esteróides do sangue e da urina encontram-se quer sob a forma livre, quer combinados com o ácido glucurónico, o ácido sulfúrico ou mais raramente com o ácido fosfórico. Dos esteróides urinários apenas uma pequena fracção se encontra no estado livre e sujeitos portanto à extracção directa pelos solventes dos lípidos. Uma fracção menos importante é transformada em ester-sulfatos, mas a maior quantidade dos esteróides é eliminada sob a forma de glucuronidos.

A estrutura dos esteróides tem grande influência no seu modo de conjugação. Os esteróides precipitáveis pela digitonina são eliminados sob a forma de sulfo-conjugados, tais como a dehidro-epiandrosterona; a epiandrosterona; o pregnano-3-beta, 17-alfa, 20-triol; o 5-alfa-pregnano-3-beta-1-20-ona, podendo-se concluir que os 3-beta-hidroxiesteróides são *Sulfo-conjugados*, e os 3-alfa-hidroxiesteróides são principalmente *Glucuro-conjugados*. Tendo presente que os esteróides conjugados urinários são compostos principalmente por glucuronidos, o método preferido para hidrolisar os esteróides glucuro-conjugados será o emprego de beta-glucuronidasas.

Este método é actualmente usado pela maioria dos autores no doseamento dos esteróides urinários, e tende a substituir a hidrólise pelos ácidos minerais, que tem o inconveniente de destruir ou modificar a estrutura de certos esteróides e de libertar muitas impurezas coradas.

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS GLUCURONIDOS DE ESTERÓIDES

A beta-glucuronidase é um enzima que hidrolisa os beta-glucuronidos em ácido glucurónico e aglicona segundo a reacção:



A distribuição da beta-glucuronidase no reino animal foi estudada por Fishman que considerou os órgãos genitais, o fígado e o baço, as fontes mais ricas. As beta-glucuronidasas estão do mesmo modo espalhadas pelas bactérias em particular em certas espécies de *Escherichia coli*.

Jarrige e Henry demonstraram a grande actividade beta-glucuronidásica do suco digestivo d'*Helix Pomatia*, e Dodgson e colaboradores nos moluscos marinhos, *Littorina littorea* e *Patella vulgata*.

Existem três preparações comerciais de beta-glucuronidase

- a beta-glucuronidase bacteriana da firma SIGMA (USA)
- » » obtida a partir do fígado de boi comercialmente conhecida por KETODASE da firma WARNER CHILCOTT (USA)
- » » d'*Helix Pomatia* da «Industrie Biologique Française» -- Paris

Estas preparações são tituladas em Unidades Fishman.

Designa-se *Unidade Fishman* a quantidade de beta-glucuronidase capaz de libertar 1 micrograma de fenolftaleína após incubação durante uma hora a 37° a um pH óptimo.

Todavia estas preparações não são equivalentes no que respeita à hidrólise dos glucuronidos dos esteróides. A quantidade de enzima a empregar depende da natureza do esteroide que se pretende libertar. O glucuronidato de pregnandiol é o mais facilmente hidrolisável, seguindo-se os glucuronidos de fenolesteróides, corticoesteróides e 17-cetoesteróides.

Em trabalhos recentes realizados com a Ketodase verificou-se que contrariamente ao observado com as glucuronidases bacteriana e de moluscos, a velocidade de hidrólise diminui em função da concentração enzimática, para além de 50 Unidades de beta-glucuronidase por ml.

Isto faz pensar na existência de um factor inibidor do enzima, e por isso certos autores aconselham a adição às urinas de reductores como a cisteína e o sulfato de sódio.

Stempfel e col. verificaram que após a administração de ácido acetilsalicílico, a velocidade de hidrólise dos corticosteróides conjugados era inversamente proporcional à concentração de glucuronidos de salicilato nas urinas.

Para Jayle a hidrólise dos glucuronidos de esteróides urinários está completa ao fim de 24 horas de incubação a 37° C e na presença de 1000 Unidades de glucuronidase d'*Helix Pomatia* por ml a um pH = 5,2 ou de 150 Unidades de glucuronidase bacteriana a pH = 6,2.

Segundo Stempfel a incubação com 750 Unidades por ml de beta-glucuronidase de fígado de boi a um pH = 4,6 a 47° C durante 15 horas é suficiente para garantir uma hidrólise total, mesmo após a administração de forte dose de salicilato.

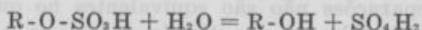
A beta-glucuronidase do S. H. P. é inibida pelo nitrato de prata, acetato de urânio, sulfato de cobre, ácido ascórbico e sacarato ácido de potássio.

CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DOS GLUCURONIDOS DE ESTERÓIDES URINÁRIOS PELAS BETA-GLUCURONIDASAS DE DIFERENTES ORIGENS

Origem da beta-glucuronidase	pH	quantidades exigidas/ml a 37° C	tempo de incubação	autores
Bacteriana	6,5-7	100-200 U	24 h	Straw, Doisy Katzman
Ketodase	5	400 U	72 h	Wilson, Borris Garrison
Ketodase	5	1000 U	72 h	Wotiz, Lemon Marais, Savard
Ketodase	4,6	750 U	15 h	Stempfel, col.
<i>Helix Pomatia</i>	5,2	750-1000 U	18-24 h	Jayle, Baulieu Henry, Thevenet
<i>Patella vulgata</i>	4,7	600 U	96 h	Brown, Blair
+ Incubação a 47° C				

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SULFATOS DE ESTERÓIDES

As sulfatases são enzimas que hidrolisam os ester-sulfatos segundo a reacção:



As três sulfatases que intervêm na hidrólise dos sulfatos de esteróides são a *arilsulfatase*, responsável pela clivagem dos sulfatos de fenolesteroides, a *esteróidesulfatase* que ataca os sulfatos de esteroides neutros e a *cortisona-sulfatase*, uma glucosulfatase, que hidrolisa os 21-sulfatos de esteróides.

As *arilsulfatases* descobertas em 1911 nos extractos de caracol *Murex Trunculus*, encontram-se muito espalhadas nos moluscos, bactérias, cogumelos, insectos, aves e mamíferos.

As esteróidesulfatases postas em evidência em 1952 no suco digestivo d'*Helix Pomatia* por Henry e col. foi encontrada nas vísceras de moluscos marinhos *Patella Vulgata* e *Littorina littorea* e nos bolores como o *Aspergillus Oryzae*.

A Glucosulfatase encontra-se nos moluscos, bactérias, cogumelos e fígado dos mamíferos, mas não está presente no suco digestivo d'*Helix Pomatia*. As fontes mais importantes de sulfatases empregadas na hidrólise dos sulfatos de esteróides são as vísceras da *Patella Vulgata*, o suco digestivo d'*Helix Pomatia* e uma preparação de *Aspergillus oryzae* que tem a vantagem sobre as sulfatases anteriores de não estar associada à beta-glucuronidase.

O doseamento da actividade sulfatásica pode fazer-se

- por hidrólise do disulfato de fenoltaleína (PPS)
- por hidrólise do sulfato de nitrocatecol (N. C. S.)
- por hidrólise do sulfato de dehidroepiandrosterona (DHAS)

Definem-se deste modo três unidades diferentes correspondendo à libertação de 1 micrograma de substrato numa hora.

A Unidade PPS é a mais utilizada, mas há autores que acham preferível titular as sulfatases em unidades de sulfato de dehidroepiandrosterona quando usadas na hidrólise dos esteróides conjugados urinários.

A actividade sulfatásica é arbitrariamente expressa pelos microgramas de substância libertada numa hora a 37°C no decorrer da hidrólise.

Os esteróides com uma configuração 3-beta-5-beta ou 3-beta-5-alfa são hidrolisados rapidamente pelas sulfatases, que são totalmente ineficazes sobre os sulfatos de esteróides de configuração 3-alfa-5-alfa. Relativamente aos outros sulfatos de esteróides a acção dos diferentes tipos de sulfatases é muito diversa.

A sulfatase d'*Helix Pomatia* parece mais activa que a sulfatase da *Patella Vulgata* para hidrolisar os sulfatos dos esteróides 3-alfa-5-beta e 3-beta-5-beta.

Pode concluir-se que a sulfatase d'*Helix Pomatia* é capaz de hidrolisar mais ou menos rapidamente todos os sulfatos dos esteróides com excepção dos sulfatos de androsterona e 5-alfa-pregnanolona do grupo dos 17 e 20 cetoesteróides.

Os sulfatos de fenolesteróides são rapidamente hidrolisados pelas sulfatases d'*Helix Pomatia* a um pH 5, a 37°C com a concentração de 500 U. PPS por ml.

Em contra-partida os sulfatos dos esteróides neutros são hidrolisados mais lentamente devido a acção inibidora dos fosfatos e sulfatos urinários. Este inconveniente pode ser eliminado de três maneiras:

— diluir as urinas e adicionar 500 U. PPS/ml. Nestas condições a quase totalidade dos sulfatos dos esteróides neutros está hidrolisada ao fim de 48 horas com excepção do sulfato de androsterona e duma maneira mais genérica dos sulfatos de esteróides com uma configuração 3-alfa-5-alfa (segundo Henry)

— precipitar os fosfatos e sulfatos pelo cloreto de bário (Cl₂Ba) a pH_n. O inconveniente do método é de ficar sempre uma pequena porção de esteróides conjugados retidos no precipitado.

— extracção dos esteróides conjugados pelo norbutanol, e acção imediata de 500 U. de sulfatase a pH_n.

HIDRÓLISE DOS DIFERENTES SULFATOS DE 3-HIDROXIESTERÓIDES PELA SULFATASE DE PATELLA VULGATA E SULFATASE DO SUCO DIGESTIVO D'HELIX POMATIA

3-sulfatos de:		Porcentagem de hidrólise em 1 hora	
		Patella vulgata (seg. ROY)	Helix Pomatia (seg. Jarrige)
Androsta-5-ene	3-beta-ol 17-ona	59 %	100 %
5-alfa-androstano	3-beta-ol 17-ona	26	68
5-beta-androstano	3-beta-ol 17-ona	0	7
5-beta-androstano	3-alfa-ol 17-ona	2	9
5-alfa-androstano	3-alfa-ol 17-ona	0	0
Pregna-5-ene	3-beta-ol 20-ona	56	90
5-alfa-pregnano	3-beta-ol 20-ona	5	100
5-beta-pregnano	3-alfa-ol 20-ona	2	3,45
5-alfa-pregnano	3-alfa-ol 20-ona	0	0
5-beta-pregnano	3-beta-ol 20-ona	0	—
Cortisona (21-sulfato)		2	100

A fenolsulfatase é inibida pelo sulfato de cobre, acetato de urânio, fluoreto de sódio, ácido ascorbico e sacarato ácido de potássio.

A associação da beta-glucuronidase e da sulfatase, enzimas presentes nas preparações do suco d'Helix e da Patella Vulgata tem a vantagem de hidrolisar simultaneamente os glucuronidos e a maior parte dos sulfatos dos esteróides.

As quantidades exigidas são de 1000 U./ml para a beta-glucuronidase e de 500 U./ml para a sulfatase quando se use o S. H. P.

O único inconveniente deste processo é de não permitir a clivagem dos esteróides de configuração 3-alfa-5-alfa como o sulfato de androsterona.

De facto este 17-cetoesteróide sulfo-conjugado não representa senão uma pequena parte dos 17-cetoesteróides conjugados totais e segundo Henry a quantidade de 17-cetoesteróides não hidrolisados por este processo não excede os 5 % dos 17-cetoesteróides totais.

Quando se pretende obter uma hidrólise total dos 17-cetoesteróides conjugados, é preferível associar a hidrólise enzimática à solvólise.

No entanto a hidrólise enzimática pela beta-glucuronidase e sulfatase liberta a quase totalidade dos fenolesteróides, corticoesteróides, pregnandiol e pregnanetriol. O rendimento da hidrólise enzimática é sensivelmente superior na presença do cianeto de mercúrio, o qual provavelmente tem um papel inibidor sobre uma reacção concorrente.

SOLVÓLISE DOS SULFATOS DE ESTERÓIDES

Dá-se o nome de *solvólise* ao desdobramento dos estersulfatos observado na presença de certos solventes orgânicos, devido à fixação do radical SO₂ sobre o oxigénio do solvente.

A solvólise diminui com o aumento da polaridade do solvente, é inversamente proporcional ao seu poder de ionização e a velocidade da solvólise depende da estru-

tura do sulfato de esteróide: muito rápida para o 21-sulfato de cortisona, mais lenta para os sulfatos de epiandrosterona e de dehidroepiandrosterona. O sulfato de androsterona é o mais lentamente solvolisado.

A solvólise respeita a estrutura dos esteróides libertados, e atinge o máximo de velocidade no tetrahidrofurano.

Como outros solventes utilizados temos o norbutanol, o acetato de etilo, e o 1,4-dioxano.

Baulieu, Weinmann e Jayle usaram a acção combinada da solvólise e da beta-glucuronidase, e Baulieu e Michaud mais recentemente a hidrólise fraccionada dos esteróides conjugados urinários, permitindo realizar numa primeira fase a solvólise dos ester-sulfatos, e numa segunda fase a hidrólise enzimática dos glucuronidos.

HIDRÓLISE DOS ESTERÓIDES CONJUGADOS PELOS ÁCIDOS MINERAIS

Os ácidos minerais como o ClH e SO_2H_2 catalisam a hidrólise dos esteróides conjugados, mantidos à ebulição.

O ácido clorídrico é o mais utilizado e as concentrações variam entre 10 a 15 %. A duração da ebulição em refluxo vai de 10 a 15 minutos para os esteróides neutros e de 45-60 para os fenolesteróides.

Os dois grandes inconvenientes da hidrólise ácida consistem:

— em dar lugar à formação de grande número de pigmentos arrastados pelos dissolventes orgânicos e difíceis de eliminar.

— provocar a destruição ou modificar a estrutura de certos esteróides, quer por desidratação quer por isomerização. Assim os 17-hidroxycorticoesteróides são na sua grande parte destruídos devido à rotura da cadeia lateral, o que faz abandonar no seu doseamento este processo de hidrólise.

Por outro lado, muitos esteróides sujeitos à hidrólise ácida dão lugar aos chamados «artefacts» de hidrólise, como os 17-cetoesteróides oxigenados em 11, e a DHA.

A adição de reductores parece não atenuar significativamente estes inconvenientes.

PROCESSOS DE HIDRÓLISE SEGUIDOS NOS DIVERSOS DOSEAMENTOS HORMONAIS

17-Cetoesteróides neutros totais

1) Hidrólise pelos ácidos minerais

A maior parte dos autores aceitam que uma hidrólise total se obtém com uma concentração de 10-15 % de ácido clorídrico (v/v) mantido com refluxo à ebulição durante 10 minutos.

A hidrólise pelos ácidos minerais tem o inconveniente de destruir ou alterar um certo número de 17-cetoesteróides tais como a 11-beta-hidroxi-androsterona e a 11-beta-hidroxi-etioiolanona (17-CS oxigenados em 11) e o sulfato de dehidroepiandrosterona que é particularmente sensível. O ácido sulfúrico não oferece qualquer vantagem sobre o ácido clorídrico sob o ponto de vista de destruição dos esteróides.

Os métodos de hidrólise mineral podem usar-se para as análises rápidas de rotina dos 17-cetoesteróides.

Quando se exige um grande rigor ou quando se trata do fraccionamento este processo não pode ser adoptado pelos inconvenientes apontados.

2) Hidrólise enzimática

A percentagem de 17-cetoesteroides libertos pela beta-glucuronidase quer seja de origem hepática, esplénica ou bacteriana varia entre 40 a 65 % dos 17-cetoesteroides doseados após hidrólise ácida.

Isto significa que os 17-cetoesteroides sulfo-conjugados não sofrem a clivagem pelas diastases Iayle e col. conseguiram libertar 60-80 % dos 17-cetoesteroides urinários pela acção durante 48 horas de 1000 U. de beta-glucuronidase d'Helix Pomatia ou de 150 U. de beta glucuronidase bacteriana.

3) Hidrólise enzimática associada à solvólise

O método mais eficaz para obter uma hidrólise total sem alterar a estrutura dos 17-cetoesteroides é combinar a hidrólise pela beta-glucuronidase à solvólise.

Corticoesteroides conjugados

1) Hidrólise ácida

Os corticoesteroides e particularmente os hidroxilados em 17 são em parte destruídos em meio ácido e à ebulição.

2) Hidrólise enzimática

É aconselhável recorrer para a hidrólise dos corticoesteroides às beta-glucuronidases. A adição de sulfatase melhora a recuperação em 5-10 %. Borth e Silber aconselham usar 10-15 vezes mais beta-glucuronidase de origem esplénica ou hepática do que de origem bacteriana.

Com a beta-glucuronidase d'Helix Pomatia numa concentração 1000 U./ml a hidrólise é completa em 15 horas a um pH 5,2 a 37° C.

Pregnandiol

1) Hidrólise ácida

A hidrólise clorídrica foi usada durante muito tempo mantendo a ebulição durante 10 minutos. Nestas condições o *pregnandiol* era alterado e o *pregnanetriol*, muito mais frágil completamente destruído.

A hidrólise em presença do tolueno veio reduzir a 5% a destruição do *pregnandiol*, mas mantém o grande inconveniente da formação de pigmentos resinosos arrastados na extração e difíceis de eliminar.

2) Hidrólise enzimática

Goldfine e Cohen demonstraram que o *pregnandiol* é o esteroide urinário mais rapidamente libertado pela beta-glucuronidase. A incubação das urinas durante a noite com 500 U. de beta-glucuronidase d'Helix Pomatia por ml permite libertar a totalidade de *pregnandiol*, *pregnanetriol* e outros esteroides afins.

A hidrólise enzimática evita a destruição dos esteroides e a libertação de pigmentos corados conseguindo obter extractos em maior grau de purificação.

Fenolesteroides

1) Hidrólise pelos ácidos minerais

Os estrogéneos conjugados aquecidos em meio clorídrico são parcialmente destruídos. Tem ainda o inconveniente como nos casos anteriores de libertar pigmentos que comprometem seriamente a purificação dos extractos.

2) Hidrólise enzimática

Diversos autores têm usado a beta-glucuronidase de diferentes proveniências para hidrolisar os estrogêneos conjugados urinários. As quantidades de enzima empregados variam conforme a sua origem sendo o poder hidrolisante da beta-glucuronidase d'*Helix Pomatia* 5-7 vezes menos activa que a beta-glucuronidase de origem bacteriana.

A beta-glucuronidase liberta apenas 90-97 % dos fenolesteroides conjugados. No final da gravidez esta percentagem diminui por aumentarem os esterés sulfatos. Por isso se deve associar à beta-glucuronidase uma sulfatase para se obter uma hidrólise completa dos fenolesteroides conjugados.

A hidrólise enzimática tem sobre a hidrólise ácida as seguintes vantagens:

1 — As quantidades de fenolesteroides libertados são superiores aos valores obtidos pela hidrólise mineral.

2 — A quantidade de pigmentos libertada pela hidrólise enzimática é muito reduzida o que simplifica os processos de purificação dos extractos.

3 — A presença na urina de glucose, aldeídos, acetona ou certos medicamentos que determinam uma perda de fenolesteroides pela hidrólise clorídrica não tem qualquer efeito sobre a hidrólise pela beta-glucuronidase e sulfatase.

A hidrólise dos esteroides conjugados é a primeira etapa importante de uma série de operações delicadas num doseamento hormonal. Exige o maior cuidado e atenção pois uma hidrólise defeituosa ou incompleta conduz sempre a resultados falsados.

A escolha do agente hidrolisante, a concentração empregada, assim como o pH e o tempo de incubação são os factores mais responsáveis por uma hidrólise perfeita.

É por isso aconselhável promover a hidrólise dos esteroides conjugados urinários pela associação da beta-glucuronidase e da sulfatase.

O suco digestivo d'*Helix* contendo simultaneamente os dois enzimas parece ser um dos agentes hidrolisantes que melhores condições reúne para assegurar uma hidrólise completa.

Centro de Documentação Farmacêutica

BIBLIOGRAFIA da Ordem dos Farmacêuticos

- HENRY, R.; THEVENET, M.; JARRIGE, P.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 897 (1952).
 HENRY, R.; THEVENET, M.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 886 (1952).
 JARRIGE, P.; HENRY, R.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 872 (1952).
 JAYLE, M. F.: *Analyse des Steroides Hormonaux* — Masson (1961).
 GOLDFINE, M. M.; COHEN, P.: *Endocrinology* **52**, 597 (1953).
 BAULIEU, E. E.; WEINMANN, S. H.; JAYLE, M. F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**, 1371 (1957).
 DODGSON, K. S.; SPENCER, B.: *Biochem. J.* **55**, 315 (1953).
 FISHMAN, W. H.; SPRINGER, B.; BRUNETTI, R.: *J. Biol. Chem.* **173**, 449 (1948).
 RONAN, F.; PARSONS, L.; NAMIOT, R.; WOTIZ, H.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**, 355 (1960).
 STEMPFEL, R. S.; SIDBURY, J. B.; MIGEON, C. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**, 814, (1960).
 WHITEHEAD, J. E. M.; MORRISON, A. R.; YOUNG, L.: *Biochem J.* **51**, 585 (1952).
 ROY, A. B.: *Biochem. J.* **62**, 41 (1956)
 JAYLE, M. F.: *Analyse des steroïdes hormonaux* — Masson 1962

BASES PARA A ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Colóquio: Relatora MARIA ADELAIDE MACHADO SÁ MARQUES
Licenciada em Farmácia

«A vida é toda química»

SEVERO OCHOA

Os licenciados em Farmácia possuem preparação bioquímica sem confronto com a que dá qualquer outra licenciatura e uma prática laboratorial de excepção, podendo legalmente fazer análises mesmo sem obrigatoriedade de estágio post-curso. Mas a verdade é que caminhando-se cada vez mais para as especializações, as análises de aplicação à clínica carecem para se exercerem de uma graduação profissional específica, de preferência universitária.

O grau de especialista de análises clínicas só corresponderá a uma preparação sólida se for alcançado após demorada e boa prática em laboratórios idóneos. Este estágio deverá ser dirigido e poderá ser feito em períodos sucessivos em diversos laboratórios, para mais facilmente o estagiário percorrer toda a gama de análises, pondo-se em contacto directo tanto com os aperfeiçoamentos técnicos como com as improvisações a que laboratórios menos apetrechados têm por vezes que recorrer nas exigências imediatas do serviço.

Enquanto uma Reforma do Ensino de Farmácia não trouxer, com a anulação da dualidade do curso, a criação de cadeiras basilares e um ensino acompanhado de estágios, orientado no último ou últimos anos para a especialização em diversos sectores (farmácia galénica, análises, indústrias);

enquanto se não criar uma verdadeira especialização universitária de Biologista, feita em 3 anos, após o diploma de licenciatura, num aprofundar de conhecimentos de Química Biológica e Biofísica, Bacteriologia, Virulogia, Parasitologia, Hematologia e Imunologia, com estágios especializados;

vimos propor, para já, devido à urgência que o problema impõe, as bases para a especialização imediata dos farmacêuticos licenciados que queiram dedicar-se às análises clínicas.

Em linhas gerais preconiza-se uma especialização universitária que consistirá:

- a) Num curso livre, de ensino dirigido, ministrado na Universidade, que oriente os licenciados no sentido desta especialização;
- b) Num estágio post-licenciatura, efectuado a par com o ensino dirigido, com duração de 2 anos, feito em laboratórios oficiais ou particulares, à escolha do candidato, embora este se possa aconselhar neste sentido junto do professor encarregado do ensino dirigido.

Espera-se do Ministério da Educação Nacional a obtenção de facilidades para o estágio dos farmacêuticos nos diversos laboratórios oficiais.

- c) Num exame de validação de estágio.

Os candidatos aprovados ficarão com o grau de especialista em análises clínicas.

Todos os farmacêuticos, licenciados ou não, que já se dediquem a análises clínicas, na data da criação da especialidade, ficarão isentos de prestação das provas de exame, podendo continuar a exercer a sua actividade como especialistas; ficarão também isentos de exame os farmacêuticos aprovados em mérito absoluto em concurso oficial de provas públicas para o qual se exija preparação equivalente à da referida especialidade.

Pormenorizando:

I — O CURSO

O plano de estudos será aprovado por decreto, ouvida a Junta Nacional de Educação, mas sugere-se uma forma de ensino dirigido, em sessões mensais, de maneira a ser seguido pelos estagiários de fora dos 3 centros universitários do país.

Em revisões de conjunto dos assuntos mais directamente ligados aos problemas correntes das análises procurar-se-á interessar os estagiários especialmente nas matérias que mais necessitam de ser praticadas.

II — O ESTÁGIO

O estágio de especialização em análises clínicas poderá fazer-se em laboratórios especializados nacionais ou estrangeiros, mas não simultaneamente com qualquer estágio preparatório de outras especializações.

III — O EXAME DE VALIDAÇÃO DO ESTÁGIO

Para a prestação de provas de validação do estágio, o candidato terá que apresentar com o seu requerimento, pública-forma do diploma de licenciatura em Farmácia, o certificado ou certificados de estágio, subscritos por quem superintenda nos serviços onde praticou e dos quais conste a sua assiduidade e aproveitamento e outros documentos que lhe interesse apresentar.

As provas a prestar serão *práticas* e *orais*, obedecendo a pontos organizados pelo Ministério da Educação Nacional.

Haverá anualmente uma época de provas, realizadas num dos três estabelecimentos de ensino de Farmácia do país, com data marcada pelo Ministério numa antecedência mínima de 90 dias.

Do júri de exame deverão fazer parte, além do presidente, quatro vogais, um de cada uma das 3 Universidades e um farmacêutico que trabalhe em análises clínicas num serviço oficial ou qualquer outro farmacêutico especialista no ramo.

Na decisão deverá atender-se ao «currículum vitae» dos examinandos.

Os candidatos que não forem aprovados só poderão requerer prestação de provas no ano seguinte.

Programa dos exames — As provas práticas durarão o máximo de 4 horas: 3 horas para as execuções laboratoriais e 1 hora para o relatório. A prova oral que será, no máximo, de 45 minutos, constará da discussão do relatório com interrogatório sobre os fundamentos teóricos dos trabalhos efectuados e, finalmente, durante os últimos 10 minutos, interrogatório livre sobre matéria da especialidade, principalmente sobre análises de rotina.

Os pontos para a prova prática serão sorteados no início das provas, entre 10 publicados com 10 dias de antecedência, não contando com o dia da afixação. Qualquer deles constará de 3 análises de aplicação à clínica, de 3 tipos diferentes:

- a 1.ª, dentro do campo da Química Biológica ou da Biofísica,
- a 2.ª, da Bacteriologia ou da Parasitologia,
- a 3.ª, da Hematologia ou da Imunologia.

Não deverão constar assuntos do conhecimento básico de qualquer licenciado em Farmácia.

Sugestões para alguns pontos:

I

- a) Determinação da reserva alcalina;
- b) Exame bacteriológico geral duma expectoração;
- c) Coloração duma lâmina de sangue e exame microscópico da mesma.

II

- a) Determinação dum tempo de protrombina;
- b) Coloração duma lâmina para pesquisa de hematozoários e exame microscópico da mesma;
- c) Sero-reacção de Widal.

III

- a) Doseamento do potássio no soro sanguíneo;
- b) Pesquisa de parasitas e seus óvulos nas fezes;
- c) Execução e coloração de gotas espessas, execução de esfregaços de sangue e contagem de plaquetas.

IV

- a) Reacção de Galli-Mainini;
- b) Prova de sensibilidade aos antibióticos duma dada bactéria;
- c) Sero-reacção de Kahn.

Centro de Documentação Farmacêutica

V

- a) Exame microscópico dum sedimento urinário;
- b) Pesquisa de Salmonellas numas fezes;
- c) Sero-reacção de Huddleson.

Uma matéria-prima em plena alteração evolutiva, além de hidratar a fração lipídica, pode apresentar oxidação dos seus ácidos gordos insaturados originando, consequentemente, uma produção de baixa qualidade e de curtos tempos de armazenagem.

O peixe no peixe congelado e no peixe seco, além de problemas sanitários de grande importância, pode levantar problemas de carácter médico-sanitário em virtude de rancidos, por vezes, originar a destruição de alguns componentes dos produtos, tais como as vitaminas A, B₁, E, etc. A ingestão de óleos rancificados chega a dar lugar a sintomas e retardar o crescimento (1).

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

- 5) Determinação da reação alcalina;
- 6) Exame bacteriológico geral numa expectoração;

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...
...deve ser feita a partir de um material...

REVISTA PORTUGUESA DE FARMÁCIA

Director: J. L. OLIVEIRA PERÚ — Presidente da Direcção

Director-Adjunto: A. MARQUES LEAL

EDIÇÃO E PROPRIEDADE DE

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

SEDE: RUA DA SOCIEDADE FARMACEUTICA, 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. GRAÇA 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. XIII * 1963

OCTUBRO-DEZEMBRO * N.º 4

TRABALHOS ORIGINAIS

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO RANÇO POR AUTO-OXIDAÇÃO PELO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO

Luís TORRES e ROMANA GRANGER
Licenciados em Farmácia

I — INTRODUÇÃO

Centro de Documentação Farmacêutica

O ranço por auto-oxidação é uma das mais importantes alterações a considerar nos produtos fabricados pelas indústrias transformadoras da pesca. A sua avaliação na matéria-prima pode dar-nos indicações sobre a qualidade final dos produtos, sobre as correcções a fazer nos métodos tecnológicos utilizados, sobre o tempo de armazenagem aconselhável, etc., etc.

Uma matéria-prima em plena alteração evolutiva, além da hidrólise da fracção lipídica, pode apresentar oxidação dos seus ácidos gordos insaturados originando, conseqüentemente, uma produção de fraca qualidade e de curtos tempos de armazenagem.

O ranço no peixe congelado e no peixe seco, além de problemas económicos de grande importância, pode levantar problemas de carácter médico-sanitário, em virtude da rancidez, por vezes, originar a destruição de alguns componentes dos produtos, tais como as vitaminas A, B₆, E, etc. A ingestão de óleos rancificados chega a dar lugar a anemias e retardo do crescimento (1).

A farinha de peixe durante a armazenagem pode incendiar-se por autocombustão, estando a produção de calor na razão directa da quantidade de óleo que possui e do seu grau de oxidação (^{2, 3}). Este grau de oxidação, segundo as teorias mais recentes, não é unicamente função da capacidade de absorção de oxigénio pelos ácidos gordos insaturados, mas sim da estrutura espacial (⁴), com existência de dois átomos de hidrogénio lábeis, e da activação influenciada pelo pH, pelo calor, luz, etc. Os peróxidos resultantes, depois de atingirem um valor máximo na fase de «auto-aceleração», diminuem lentamente originando outros produtos, mais rapidamente do que vão sendo ressinetizados.

Em todo o processo oxidativo podemos considerar cinco fases:

- 1 — Sensibilização da molécula com fraca absorção de oxigénio e produção de radicais livres;
- 2 — Grande absorção de oxigénio com rápida formação de peróxidos até a um valor máximo;
- 3 — Decomposição dos peróxidos com libertação de energia, formação de compostos com menor número de átomos de carbono e produção dos radicais OH;
- 4 — Polimerizações;
- 5 — Bloqueio dos radicais livres.

A composição lipídica dos produtos marinhos varia com as espécies (⁵), predominando na quase totalidade dos casos os ácidos gordos insaturados poliénoicos o que, complica e dificulta a resolução dos problemas de rancificação. Assim, por exemplo (⁶), o óleo de fígado de bacalhau e o óleo de arenque apresentam, respectivamente, 32,6 % e 31,7 % de ácidos poliénoicos, 50 % e 49 % de monoénoicos e apenas 17,4 % e 19,3 % de ácidos saturados.

Não obstante a grande importância desta alteração, o mecanismo da sua evolução ainda se não encontra bem esclarecido, nem tão-pouco as técnicas laboratórias quantitativas nos dão sempre valores reais. Assim as técnicas analíticas preconizadas e mais usualmente empregues, dão-nos valores com elevados «erros de oxigénio». A técnica de LEA, que também possui limitações, emprega-se sobretudo em estudos comparativos de estabilização ou de catálise.

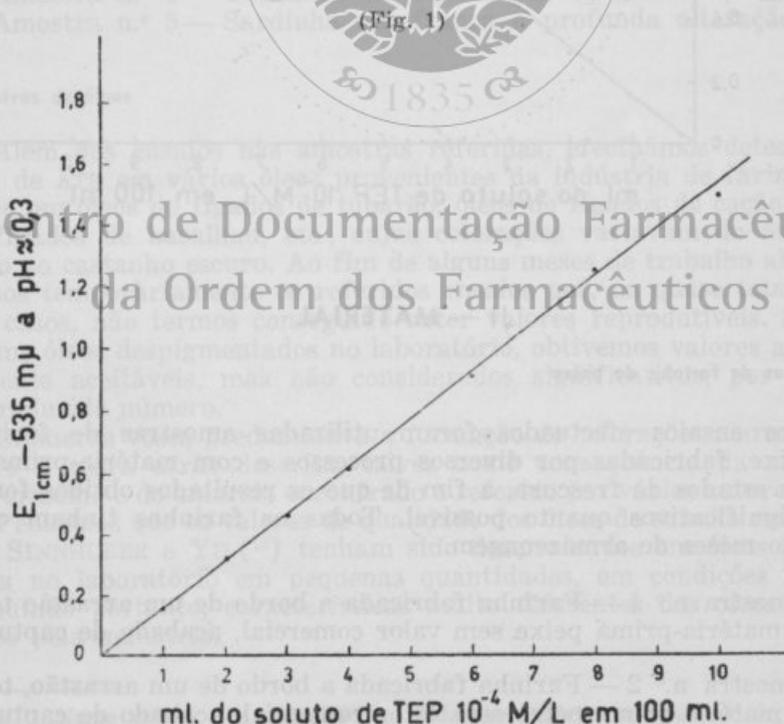
KOHN e LIVERSEGE (⁷) verificaram que suspensões de alguns tecidos, em incubação aeróbia, produziam com ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) uma coloração rósea. BERNHEIM e colab. (⁸) atribuem esta coloração a compostos com três átomos de carbono, contendo um grupo aldeídico ou cetónico, derivados da oxidação dos ácidos gordos insaturados. Alguns autores passaram, então, a preocupar-se com este problema, não só em relação à determinação do ranço nos produtos da pesca, mas sim, de uma forma geral, nos produtos alimentares susceptíveis de rancificarem (^{9, 10, 11, 12, 13}).

JENNINGS e colab. (¹⁴) verificaram que o ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) reage com os aldeídos aromáticos, produzindo fortes colorações, sendo o aldeído malónico, segundo PATTON, o verdadeiro responsável pela formação da coloração rósea acima referida, que apresenta um máximo de absorção a 535 m μ .

Também SMITH e colab. (15) no estudo da acção das radiações sobre a carne de vaca, observaram que a cor rósea era devida a duas substâncias: o malonaldeído com um máximo a 534 $m\mu$ e o glioxal a 532 $m\mu$.

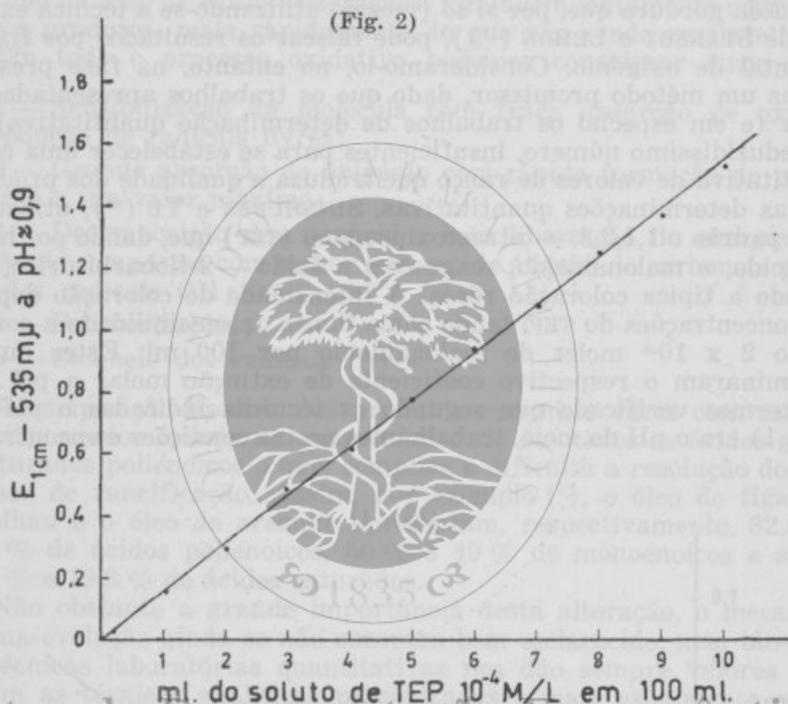
O emprego do ATB na avaliação do ranço, mostra-se apenas válido nos casos em fase de «auto-aceleração», o que parece ser uma limitação do método; no entanto, a fase «indutiva» só tem sido detectável pelo potencial redox (16). Este método, em relação aos imprecisos métodos tradicionais, tem entre outras, a vantagem de não obrigar à extracção prévia da gordura que, por si só [mesmo utilizando-se a técnica extractiva de STANSBY e LEMON (17)], pode falsear os resultados por fixação accidental de oxigénio. Consideramo-lo, no entanto, na fase presente, apenas um método promissor, dado que os trabalhos apresentados até agora (e em especial os trabalhos de determinação quantitativa) são em reduzidíssimo número, insuficientes para se estabelecer uma escala quantitativa de valores de ranço que traduza a qualidade dos produtos.

Nas determinações quantitativas, SINNHUBER e YU (18), utilizaram como padrão o 1,1,3,3 — tetraetoxipropano (TEP) que, dando por hidrólise ácida, o malonaldeído, reage com o ácido — 2-tiobarbitúrico, produzindo a típica coloração rósea. A intensidade de coloração depende das concentrações do TEP, tendo como limite de sensibilidade a concentração 2×10^{-8} moles de malonaldeído por 100 ml. Estes autores determinaram o respectivo coeficiente de extinção molar a $\text{pH} \approx 0,9$. Por termos verificado que segundo as técnicas indicadas o $\text{pH} \approx 0,3$ (Fig. 1) era o pH do meio, trabalhámos nestas condições e encontrámos



o coeficiente de extinção molar $1,54 \times 10^{-5}$ que não difere significativamente do por nós determinado a $\text{pH} \approx 0,9$ (Fig. 2). A $1,54 \times 10^{-5}$ corresponde o factor 47.

Esta constante multiplicada pelos valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a $535\text{m}\mu$ dá-nos o número de ATB ou seja o número de miligramas de malonaldeído por 1000 gramas de amostra.



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

II — MATERIAL

Amostras de farinha de peixe

Nos ensaios efectuados foram utilizadas amostras de farinhas de peixe, fabricadas por diversos processos e com matéria-prima em vários estados de frescura, a fim de que os resultados obtidos fossem tão significativos quanto possível. Todas as farinhas tinham cerca de oito meses de armazenagem.

Amostra n.º 1 — Farinha fabricada a bordo de um arrastão tendo como matéria-prima peixe sem valor comercial, acabado de capturar;

Amostra n.º 2 — Farinha fabricada a bordo de um arrastão, tendo como matéria-prima peixe sem valor comercial, acabado de capturar;

Amostra n.º 3 — Farinha produzida com detritos de sardinha, da indústria conserveira;

Amostra n.º 4 — Farinha produzida com detritos da indústria conserveira, em adiantado estado de decomposição;

Amostra n.º 5 — Farinha produzida com matéria-prima em bom estado de frescura, seca ao sol, em eira;

Amostra n.º 6 — Farinha produzida com detritos e toutiços de sardinha em adiantado estado de decomposição;

Amostra n.º 7 — Farinha produzida com matéria-prima em bom estado de frescura;

Amostra n.º 8 — Farinha produzida com toutiços de cavala;

Amostra n.º 9 — Farinha fabricada a bordo com peixe de arrasto acabado de capturar;

Amostra n.º 10 — Farinha «integral» contendo as águas residuais incorporadas.

Amostras de peixe (1)

Amostra n.º 1 — Bacalhau em bom estado de frescura tendo sido congelado a bordo, na altura da captura;

Amostra n.º 2 — Bacalhau alterado com forte cheiro a metilaminas

Amostra n.º 3 — Pombo alterado;

Amostra n.º 4 — Cachucho em bom estado de frescura;

Amostra n.º 5 — Sardinha em franca e profunda alteração.

Amostras de óleos

Além dos ensaios nas amostras referidas, efectuámos determinações de ATB em vários óleos provenientes da indústria de farinha de peixe em óleos de fígados de tubarão, óleos de fígados de cação, óleos de fígados de bacalhau, etc., cujas colorações variavam do amarelo claro ao castanho escuro. Ao fim de alguns meses de trabalho abandonámos temporariamente os referidos ensaios por, na quase totalidade dos casos, não termos conseguido obter valores reprodutíveis. Só em alguns óleos despigmentados no laboratório, obtivemos valores analiticamente aceitáveis, mas não considerados significativos, por serem em reduzido número.

Inúmeras vezes predominava a formação de colorações alaranjadas sobre a rósea atrás descrita, talvez como consequência da mistura do vermelho e do amarelo encontrado e referido por vários autores.

Pensamos que os valores de qualidade dos óleos de salmão referidos por SINNHUBER e YU (19) tenham sido determinados em óleos produzidos no laboratório em pequenas quantidades, em condições ideais, possuindo portanto, características muito diferentes dos óleos fabricados pela indústria.

(1) Nome vulgar por que são conhecidas as espécies no mercado de Lisboa.

Tínhamos já terminado o manuscrito deste trabalho quando foi demonstrada, também por YU e SINNHUBER (¹⁸), a necessidade de se proceder a remoção do pigmento amarelo interferente. Contudo estes Autores não apresentaram novos ensaios com óleos de peixe.

Segundo KONING (²¹) a irregularidade de valores verificada nos óleos, é atenuada pela substituição do sistema de duas fases «água-óleo» por um monofásico de álcool etílico.

III — MÉTODOS

Reagentes

Sol. de cloridrato de piridina — Misturar 30 ml. de piridina com 70 ml. de Cl H 6N;

Ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) — De acordo com KOHN e LIVERSEGE (⁷), adicionar 2 g de ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) — Eastman-kodak — a 193 ml de água e 6,6 ml de OH Na 2N. Aquecer a banho-maria até dissolução. Pelo aquecimento forma-se uma coloração mais ou menos turva e amarelada. Adicionar 0,7 ml de ClH 4N e descorar com 50 mg de carvão (Merck. U. S. P.). Repetir a operação 3-4 vezes até descoloração.

Tampão de citrato — Adicionar 59 g de citrato trissódico a 50 ml de ácido clorídrico. Perfazer o volume de 400 ml com água; filtrar.

Reagente completo — Misturar 2 partes de sol. de ácido-tiobarbitúrico com 1 parte do tampão citratado; ajustar a pH 2,6 se for necessário.

Sol. de ácido tricloroacético — Dissolver 20 g de ácido tricloroacético em água destilada e completar o volume de 100 ml.

Mistura de ácidos clorídrico, tricloroacético e piridina — Misturar 650 ml de ClH 0,6N com 50 ml da solução de ácido tricloroacético e 50 ml da solução de cloridrato de piridina.

Sol. de 1,1,3,3 — tetraetoxipropono (TEP) — Preparar soluções em etanol a 40 % desde 0,0002 a 0,001 M/L.

Éter de petróleo — J. T. Baker Chemical Co.

da Ordem dos Farmacêuticos

Técnica

Depois das amostras convenientemente homogeneizadas, pesar 0,220 - 0,260 g no caso de farinha de peixe de acordo com YU e SINNHUBER (²⁰) — para um balão de 250 ml. Adicionar 4 ml de água destilada, 5 ml da sol. de cloridrato de piridina, 10 ml da sol. de ácido tricloroacético e 6 ml da sol. de ATB.

Evitar agitar o balão. Aquecer com refluxo a banho-maria em franca ebulição, durante 30 minutos. Pelo refrigerante adicionar 75 ml da mistura ácido clorídrico, ácido tricloroacético e piridina. Agitar o balão um pouco e continuar o aquecimento com refluxo durante 10 minutos. Arrefecer com auxílio de gelo, sem desligar o referigeraente.

Centrifugar a 1800 r. p. m. cerca de 40 ml da solução corada obtida, durante 5 minutos. Medir 15 ml da solução depois de clarificada,

adicionar 10 ml de éter de petróleo e agitar vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugar a 1200 r. p. m. durante 3 minutos. Medir E_{1cm}^{535} a 535 m μ . (Foi utilizado um espectrofotómetro Beckman DU).

No caso do peixe fresco, pesar 0,900 - 1,100 g de substância, adicionar 3 ml de água destilada, dispersar muito bem a amostra com uma vareta, e seguir a técnica indicada nas farinhas de peixe.

A técnica utilizada nas determinações com o TEP foi a mesma descrita para as farinhas, com as seguintes modificações:

Adicionar CIH 0,6 N em substituição do cloridrato de piridina e do ácido tricloroacético. Depois do aquecimento de 30 minutos com refluxo adicionar, pelo refrigerante, 75 ml de CIH 0,6 N.

Os ensaios a branco deram extinções da ordem de 0,003.

IV — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Julgamos os resultados obtidos com as farinhas de peixe (Tab. 1) concordantes com os caracteres organolépticos e com a qualidade

TABELA 2

TABELA 1

Amostras de farinhas de peixe

Amostras de peixe

Amostras	Números de ATB $P' = 0,05$ $N = 5$	Amostras	Números de ATB $P' = 0,05$ $N = 5$
1	58,49 \pm 1,99	1	1,84 \pm 0,25
2	38,99 \pm 0,57	2	1,95 \pm 0,34
3	65,68 \pm 1,84	3	2,70 \pm 0,12
4	143,63 \pm 3,55	4	0,99 \pm 0,12
5	72,75 \pm 3,21	5	43,70 \pm 2,82
6	158,55 \pm 0,43		
7	44,10 \pm 1,70		
8	97,18 \pm 2,48		
9	49,62 \pm 1,40		
10	90,24 \pm 1,89		

da matéria-prima utilizada no respectivo fabrico. Salientamos, no entanto, que a amostra N.º 5 embora fabricada com peixe em bom estado de frescura, apresenta um número de ATB bastante elevado em relação às restantes. Pensamos que esta discrepância seja devida ao facto de, no seu fabrico, se ter usado o processo de secagem natural, ao sol e em más condições climatéricas.

Quanto aos números de ATB das amostras de peixe (Tab. 2) salientamos terem-se obtido valores muito próximos nas amostras 1 e 2, à primeira vista em desacordo com a grande diferença de graus de frescura. Esclarecemos, no entanto, que a amostra N.º 2 apresentava forte cheiro a metilaminas, mas o cheiro a ranço não era detectável.

Os valores das restantes amostras parecem concordantes com os caracteres organolépticos respectivos.

Nos casos de números de ATB muito baixos, como por exemplo, nas amostras de peixe N.^{os} 1, 2 e 4, parece-nos conveniente aumentar as tomas (0,900 g-1,100) preconizadas por YU e SINNHUBER (20) de forma a não se trabalhar com concentrações próximas do limite de sensibilidade do método: 2×10^{-8} moles de malonaldeído por 100 ml.

V — RESUMO

Os Autores fizeram a determinação quantitativa da rancidez de alguns produtos marinhos (peixes e farinhas de peixe) com o ácido 2-tiobarbitúrico (ATB), o qual reagindo com o malonaldeído produz uma coloração rósea, com um máximo de absorção a $535 m\mu$.

O valor do respectivo coeficiente de extinção molar, determinado a pH $\approx 0,3$ — pH normal de trabalho — foi $1,54 \times 10^{+5}$, a que corresponde a constante 47. Os valores de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ multiplicados por este factor, dão directamente os números de ATB.

Os ensaios efectuados nas amostras de farinhas de peixe e em peixe deram resultados concordantes com a sua qualidade. No entanto nas amostras de peixe N.^{os} 1, 2 e 4 apresenta-se uma maior dispersão de valores, talvez devido aos baixos números ATB encontrados, próximos do limite de sensibilidade do método: 2×10^{-8} moles de malonaldeído por 100 ml.

RÉSUMÉ

Les Auteurs ont fait la détermination quantitative de la rancidité de quelques produits marins (poissons et farines de poisson) par l'acide 2-thiobarbiturique (ATB), lequel par réaction avec le malonaldehyde produit une coloration rose à un maximum de $535 m\mu$.

La valeur du coefficient d'extinction molaire respectif, déterminée pour un pH $\approx 0,3$ — pH normal de travail — a été de $1,54 \times 10^{+5}$, à laquelle correspond le facteur 47.

Les valeurs de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ multipliées par ce facteur donnent directement les numeros ATB.

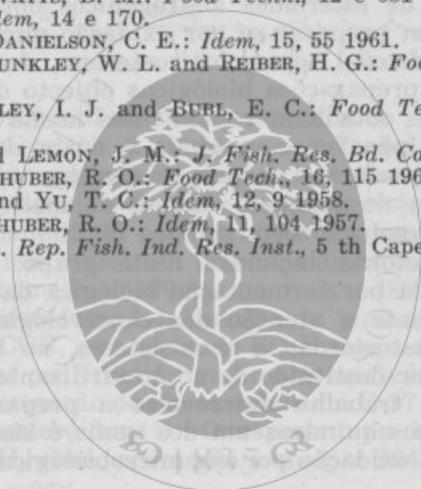
Des essais effectués sur des farines, soit sur le poisson ont conduit à des résultats qui s'accordent avec leur qualité. Néanmoins dans les échantillons de poisson N.^{os} 1, 2, 4 cette concordance est moins nette, ce qui est, peut-être, en rapport avec les faibles numeros ATB trouvés, voisins de la limite de sensibilité de la méthode: 2×10^{-8} Moles de malonaldéhyde par 100 ml.

SUMMARY

It is realized the quantitative determination of the rancidity by 2-thiobarbituric acid in fish meal and fresh fish samples. By this method, the malonaldehyde content of fishery products was quantitatively measured and the oxidative rancidity expressed in milligrams of malonaldehyde per 1.000 g of sample: TBA number.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BAILEY, B. E.: *Marine Oils Bull.* n.º 89, p. 104 1952.
- (²) WILLMER, J. S. and WILLIAMS, D. T.: *Ann. Rep. Fish. Res. Inst.*, 7 th, Cape Town 1953/54.
- (³) LEWIS, A. M.: *Idem*, 5 th 1951/52.
- (⁴) VERDAGUER, P. A.: *Medic. Ed. Farm.*, n.º 191, p. 8 1960.
- (⁵) BORSTROM, G.: *Fish as Food*, 2.º vol. Acad. Press.
- (⁶) TRONDHEIM, O. N.: *Symp. Cured and Frons. Fish. Techn.* Göteborg. Novemb.
- (⁷) KOHN, H. I. and LIVERSEGE, M.: *J. Pharm. and Exp. Therap.* 82 e 292 1953.
- (⁸) BERNHEIM, F., BERNHEIM, M. L. C. and WILLBUR, K. M.: *J. Biol. Chem.* 174 e 247 1948.
- (⁹) TURNER, E. W., PAYNTER, W. D., MONTIE, E. J., BESSERT, M. W., STRUCK, G. M. and OLSON, F. C.: *Food Techn.* 8 e 326 1954.
- (¹⁰) SCHWARTZ, M. G. and WATTS, B. M.: *Food Research*, 20 e 13 1955.
- (¹¹) HOUGHAM, D. and WATTS, B. M.: *Food Techn.*, 12 e 681 1958
- (¹²) HOUGHAM, D. F.: *Idem*, 14 e 170.
- (¹³) ANDERSON, K. and DANIELSON, C. E.: *Idem*, 15, 55 1961.
- (¹⁴) JENNINGS, W. G., DUNKLEY, W. L. and REIBER, H. G.: *Food Research*, 20, 13 1955.
- (¹⁵) SMITH, N. L., TINSLEY, I. J. and BUBL, E. C.: *Food Techn.* 14, 317 1960.
- (¹⁶) Cit. em 1, p. 172.
- (¹⁷) STANSBY, M. E. and LEMON, J. M.: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 7, 137 1947.
- (¹⁸) YU, T. C. and SINNHUBER, R. O.: *Food Techn.*, 16, 115 1962.
- (¹⁹) SINNHUBER, R. O. and YU, T. C.: *Idem*, 12, 9 1958.
- (²⁰) YU, T. C. and SINNHUBER, R. O.: *Idem*, 11, 104 1957.
- (²¹) KONING, A. J.: *Ann. Rep. Fish. Ind. Res. Inst.*, 5 th Cape Town 1961.



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

D-HOMOLACTONAS ESTERÓIDES

SÍNTESE QUÍMICA DA BISDEIDROTESTOLOLACTONA

J. M. NASCIMENTO e M. H. VENDA

Engenheiros-químicos

As lactonas de esteroides androgénicos obtidas por expansão do anel D costumam preparar-se por oxidação microbiológica da progesterona, 17 α -hidroxi-11-deoxicorticosterona, testosterona (^{1,2}) sendo algumas destas preparações biológicas objecto de patentes (^{3,4}).

Desde que se obtenham rendimentos aceitáveis, a fabricação por via química, se não for conseguida à custa de processos altamente complicados, é preferível à preparação por via microbiológica que exige o emprego de grandes volumes de meios de cultura e conduz a misturas de resolução nem sempre fácil.

Uma das lactonas incluídas neste grupo, a bisdeidrotestololactona (⁴) já obtida por fermentação biológica da progesterona (⁴) despertou ultimamente a atenção dos cancerologistas (⁵) como possível substituto da testosterona e seus ésteres, no tratamento do cancro da mama, por ser destituído de acção virilizante.

No presente trabalho descreve-se a preparação deste composto por dois processos químicos um dos quais é susceptível de substituir com vantagem a oxidação por via microbiológica.

Processo A — Preparação a partir do acetato de deidroisoandrosterona.

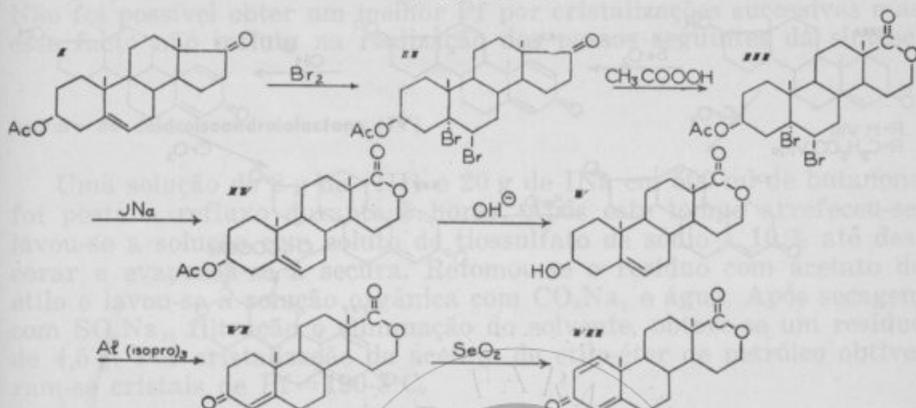
Este processo define-se segundo um esquema já parcialmente utilizado na preparação e estabelecimento da estrutura da testololactona (⁶) e apresenta sobretudo interesse teórico.

O acetato de deidroisoandrosterona (I) bromo-se em tetracloreto de carbono originando um derivado dibromado em 5,6 (II) que por oxidação em ácido peracético se transforma na lactona (III). A desbromação de (III) por INa em butanona origina uma cetona insaturada (IV) e a hidrólise subsequente conduz à deidroisoandrololactona (V). Por oxidação de Oppenauer deste produto com isopropóxido de alumínio em ciclohexanona obtém-se a testololactona (VI) que por acção de O₂Se se transforma em bisdeidrotestololactona (VII).

O baixo rendimento global desta síntese ($\eta = 5\%$ em relação a I) é agravado sobretudo na última fase de reacção que subministra um produto que foi necessário submeter a purificação cuidada por cromatografia em coluna de óxido de alumínio para eliminação do selénio e dos compostos seleniados.

A identificação dos intermediários desta síntese foi efectuada comparando as constantes físicas obtidas por nós com as descritas em (⁶). A identificação de (VII) obteve-se verificando a correspondência das

Processo A



suas constantes físicas (ponto de fusão, espectro U. V., e poder rotatório) com as descritas em (°). A ausência de coloração de (VII) com a 2,4-dinitrofenilhidrazina observada com o composto (VI), o valor de $\lambda_{\text{max}} = 241 \text{ m}\mu$ do espectro de U. V. e a fluorescência à luz ultravioleta da solução depositada no papel tratado em seguida com OHNa são outros índices que nos indicam a presença do cromóforo 1,4-dieno-3-ona. A coloração vermelha ($400 \text{ m}\mu < \lambda_{\text{max}} < 480 \text{ m}\mu$) observada nos compostos com cromóforo 1,4-dieno-3-ona possuindo em C-17 o grupo $-\text{OH}$, $=\text{O}$ ou $-\text{OCOR}$, por acção de SO_3H conc. não se verificou com este composto o que confirma a ligação que existe entre esta característica, e a possível formação de íon carbónio em C-17 que se encontra impedida nos D-homoesteróides (°). O espectro da bisdehidrotestolactona a 1% em SO_4H_2 conc. apresenta $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ m}\mu$ $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 466$ e $\lambda_{\text{max}} = 306 \text{ m}\mu$ $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 256$.

Processo B — Preparação a partir da testosterona ou seus ésteres.

O processo A é muito laborioso devido à necessidade de efectuar a protecção da dupla ligação e a sua regeneração depois de obtida a formação do anel lactónico em D.

Com vista a evitar a protecção da dupla ligação durante o ataque por perácidos da função 17-cetona, estudámos o comportamento do cromóforo 1,4-dieno-3-ona em relação a este tipo de reagentes.

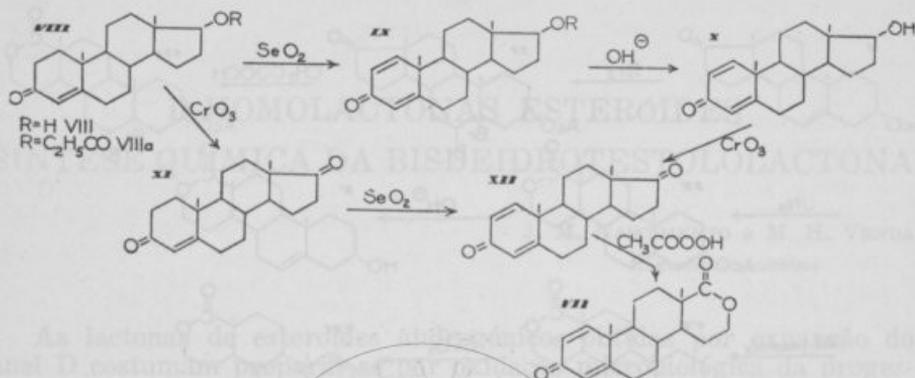
Pudémos concluir que este grupo funcional se mantém estável nas condições que originam a formação de D-homolactonas.

Os ensaios efectuados com metandrostenolona permitiram concluir não haver transformação deste esteróide e o mesmo tipo de reacções ensaiado na Δ^1 -testosterona originou o derivado acetilado em C-17 conservando-se o anel A inalterado.

A constatação desta estabilidade que não se observa paralelamente com o cromóforo 4-eno-3-ona (°) permitiu-nos gizar um novo esquema de síntese.

O propionato de testosterona (VIIIa) submete-se à desidrogenação por O_2Se originando o composto Δ_1 correspondente (IX).

Processo B



Por acção dos alcalis origina-se o álcool livre (X) que oxidado por CrO₃ se transforma no derivado cetónico (XII). Este mesmo composto foi obtido a partir da testosterona (VIII) após oxidação com CrO₃ que originou (XI) o qual por acção de O₂Se se transformou em (XII). A identidade das substâncias obtidas por ambos os processos foi confirmada pela determinação do Pf misto, igualdade dos poderes rotatórios e comportamento em cromatografia no papel. Deste modo pudemos também estabelecer que não se forma com rendimento apreciável nenhum derivado com dupla ligação em posição alílica com respeito ao carbonilo em C-17, por acção do O₂Se. A bisdehidrotostololactona (VII) obteve-se finalmente por acção do ácido peracético sobre o composto (XII).

PARTE EXPERIMENTAL

Os Pf foram determinados em bloco de KOFLER e não foram corrigidos.

5,6-dibromo-3 (β)-acetoxiandrosterano-17-ona (II)

Dissolveu-se 8 g de acetato de deidroisoandrosterona em 160 ml de CCl₄, arrefeceu-se a solução e juntou-se lentamente 100 ml de CCl₄ contendo 4,16 g de bromo. Depois da solução ter descorado, ao fim de algum tempo concentrou-se, e o produto bromado cristalizou. Os cristais recolheram-se sobre filtro de Büchner isolaram-se após lavagem com acetona quente obtendo-se 10,35 g de produto de Pf = 172-5°C.

5,6-dibromo-3 (β)-acetoxiandrololactona (III)

Dissolveu-se 10,3 g de (II) em 80 ml de ácido acético glacial e a esta solução adicionou-se 200 ml de uma solução de ácido peracético em ácido acético juntamente com 200 mg de ácido p-tolueno-sulfónico. Após aquecimento a 35° durante 23 horas precipitou-se a substância cristalizada da solução, por adição de água. Os cristais obtidos no total

de 8 g cristalizaram-se do acetato de etilo e apresentaram $Pf = 165-75^{\circ}C$. Não foi possível obter um melhor Pf por cristalizações sucessivas mas esse facto não influenciou na realização dos passos seguintes da síntese.

acetato de deidroisoandrololactona (IV)

Uma solução de 8 g de (III) e 20 g de INa em 500 ml de butanona foi posta a refluxo durante 5 horas. Após este tempo arrefeceu-se, lavou-se a solução com soluto de tiosulfato de sódio a 10% até descolorar e evaporou-se à secura. Retomou-se o resíduo com acetato de etilo e lavou-se a solução orgânica com CO_3Na_2 e água. Após secagem com SO_4Na_2 , filtração e eliminação do solvente, obteve-se um resíduo de 4,5 g. Por cristalização do acetato de etilo-éter de petróleo obtiveram-se cristais de $Pf = 190-3^{\circ}C$.

deidroisoandrololactona (V)

Dissolveu-se 4,5 g de (IV) não cristalizado em 120 ml de metanol a que se adicionou 70 ml de água contendo 9,3 g de bicarbonato de potássio e submeteu-se a mistura a refluxo durante 4 horas. Acidificou-se em seguida com 30 ml de ClH 3N e manteve-se a mistura a $100^{\circ}C$ durante 1 hora e em atmosfera de azoto. Arrefeceu-se, adicionou-se água e recolheu-se o precipitado com 3,7 g.

Por cristalização do acetato de etilo obtiveram-se cristais de $Pf = 243-7^{\circ}C$.

Testololactona (VI)

Submeteu-se a refluxo durante 48 horas uma solução contendo 3,7 g de (V), 3,7 g de isopropóxido de alumínio, 3,7 ml de ciclohexanona e 11 ml de tolueno seco. Arrefeceu-se em seguida, diluiu-se com éter e lavou-se a suspensão sucessivamente com ClH 2N, CO_3HNa 2N e uma solução aquosa saturada com $ClNa$. A sol. etérea secou-se removeu-se o solvente por evaporação a b. m., obtendo-se um resíduo de 2,5 g que se cristalizou do álcool-éter. $Pf = 210-3^{\circ}C$. $[\alpha]_D = +42$ $c = 1,01$ em clorofórmio.

Bisdeidrotestololactona (VII)

Aqueceu-se a refluxo durante 5 horas uma solução de 500 mg de (VI) em 10 ml de t-butanol contendo 0,1 ml de ácido acético e 216 mg de bióxido de selénio após o que se adicionou ainda 66 mg de O_2Se mantendo-se à ebulição por mais 16 horas. Em seguida arrefeceu-se, filtrou-se evaporou-se à secura e retomou-se o resíduo com clorofórmio. Após lavagem com ClH 2N, CO_3Na_2 2N, secagem com SO_4Na_2 , e evaporação do solvente obteve-se um resíduo de 632 mg. Este resíduo cromatografou-se sobre 15 g de O_3Al_2 , e as fracções eluídas com ben-

zeno-clorofórmio 15% e clorofórmio, num total de 319 mg, mostraram em cromatografia no papel ser constituídas por uma única substância diferente da testololactona.

Estas fracções reuniram-se, cromatografaram-se de novo sobre óxido de alumínio originando 84 mg de cristais Pf = 218-22°C.

$$[\alpha]_D = -43^\circ \text{ c} = 1,185 \text{ em clorofórmio}$$

O espectro de U. V. apresenta $\lambda \text{ max} = 242 \text{ m}\mu$ (álcool absoluto)
 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 520$

Androsta-1,4-dieno-3ona-17-propionato (IX)

A uma solução de 9,2 g de propionato de testosterona em 150 ml de t-butanol contendo 1,5 ml de ácido acético adicionou-se 2,8 g de bióxido de selénio e 0,5 ml OH_2 . Manteve-se 5 horas a refluxo e ao fim deste tempo adicionou-se 200 mg de bióxido de selénio e continuou-se o aquecimento a refluxo durante 16 horas. O resíduo bruto após eliminação do álcool, dissolução em clorofórmio e lavagem com CO_3Na_2 deu um resíduo de 5,4 g. Após filtração sobre O_3Al_2 obteve-se por cristalização de éter de petróleo 2,2 g de substância com Pf = 143-7°C.

Androsta-1,4-dieno-3-ona-17-ol (X)

2,2 g de (IX) foram aquecidos a refluxo durante 1,5 horas sob atmosfera de azoto em 100 ml de solução metanólica a 5% de OHK. Destilou-se o metanol, e adicionou-se água e extraiu-se a solução hidro-alcoólica com clorofórmio. O resíduo de extracção do clorofórmio cristalizou, obtendo-se 351 mg cristais de Pf = 174-77°C e um resíduo amorfo de 1,24 g do mesmo produto.

Androsta-1,4-dieno-3,17-diona e partil de (XII)

Dissolveu-se 300 mg de (X) em 15 ml de ácido acético a que se adicionou 6 ml de óxido de crómio a 2% em ácido acético. Após 2 horas adicionou-se 15 ml de metanol e deixou-se em repouso durante a noite. Evaporou-se o ácido acético à secura, retomou-se com clorofórmio, lavou-se com $\text{ClH} \text{ 2N}$, $\text{CO}_3\text{Na}_2 \text{ 2N}$, OH_2 secou-se com SO_4Na_2 filtrou-se e evaporou-se à secura. O resíduo foi purificado por filtração numa coluna de 1 g de O_3Al_2 , fornecendo 170 mg de cristais de Pf = 142-3°C e 50 mg de resíduo amorfo constituído pela mesma substância.

Androsta-4-eno-3,17-diona (XI)

Submeteu-se 1 g de testosterona à oxidação crômica procedendo-se de maneira análoga à que se utilizou para a preparação de (XII) obtendo-se 1,04 g de (XI) que se utilizou sem purificação prévia na operação seguinte.

Androsta-1,4-dieno-3,17 diona a partir de (XII)

1,04 g de (XI) em 20 ml de t-butanol contendo 0,2 ml de AcOH foi aquecido a refluxo com 400 mg de O_2Se e 0,05 ml de água. Procedeu-se como em (IX) e obteve-se um resíduo bruto de 869 mg. Este resíduo cromatografou-se sobre 1 g de O_3Al_2 e a fracção arrastada com benzeno-clorofórmio 50 % com o peso de 430 mg mostrou em cromatografia no papel ser constituída por uma substância com o mesmo comportamento cromatográfico de androsta-1,4-dieno-3,17-diona.

Bisdeidrotestolactona (VII)

Dissolveram-se 430 mg de (XII) em 4 ml de AcOH a que se adicionou 10 ml de ácido peracético e cerca de 10 mg de ácido p-toluenosulfónico e manteve-se a solução a $35^\circ C$ durante 23 horas. Adicionou-se água à solução acética e extraiu-se várias vezes a solução ácida com igual volume de clorofórmio. Os solutos clorofórmicos foram lavados com CO_3Na_2 2N, e água e depois de secos sobre SO_4Na_2 levados à secura, obtendo-se um resíduo de 321 mg. Após recristalização da acetona-éter obteve-se 246 mg de cristais $Pf = 218-20^\circ C$.

$[\alpha]_D = -43^\circ$ ($c = 1,185$ em clorofórmio) e $\lambda_{max} = 242 m\mu$.

Os cristais e as águas-mães originaram no papel uma única mancha visível à fluorescência no U. V. após tratamento do papel com $OHNa$.

Estabilidade do cromóforo 1,4-dieno-3-ona em relação aos perácidos

Diferentes amostras de 100 mg de androsta-1,4-dieno-3,17 diona foram dissolvidas em 0,8 ml de ácido acético a que se adicionaram 2 ml de ácido peracético e alguns cristais de ácido p-toluenosulfónico, e depois colocadas em estufa a $35^\circ C$.

As amostras foram retiradas ao fim de 1, 3, 6 e 12 horas. Após isolamento pelo processo usual e controlo cromatográfico verificou-se que a transformação é completa ao fim de 6 horas com rendimento de transformação elevado.

80 mg de androsta-1,4-dieno-17 β -ol foram oxidados como na experiência anterior obtendo-se 60 mg de fracção neutra e 11 mg de fracção ácida. A fracção neutra era constituída pelo acetato da substância inicial $Pf = 151-3^\circ C$ o que se comprovou por cromatografia no papel e determinação de Pf misto de substância genuína.

Nota: O ácido peracético utilizado nestes ensaios foi obtido fazendo reagir uma mistura de 45 ml de anidrido acético e 0,5 ml de SO_4H_2 concentrado com 10 ml de água oxigenada a 130 volumes que se adicionou lentamente e arrefecendo a $10^\circ C$.

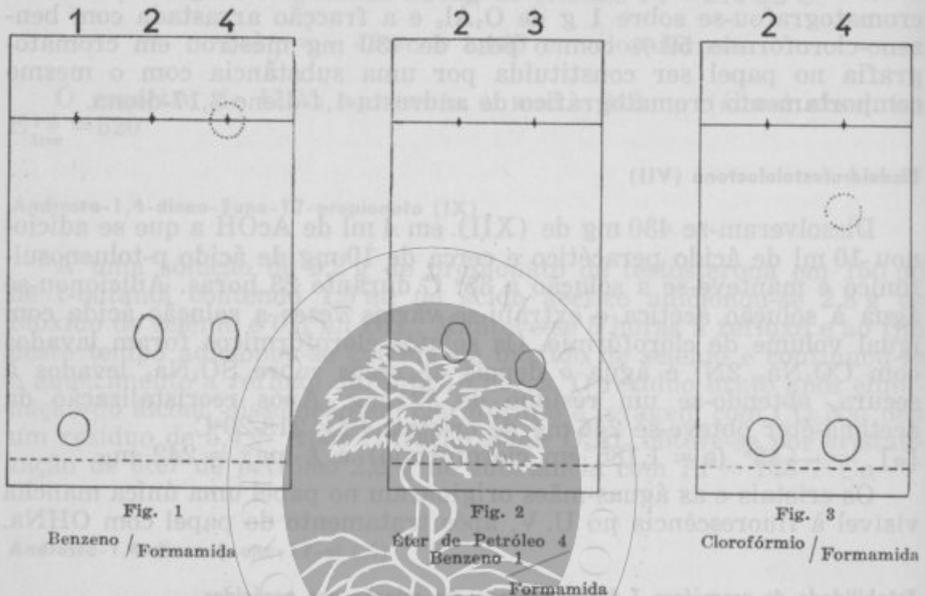
Ensaio de cromatografia descendente no papel

O papel utilizado foi o papel Whatmann n.º1.

As substâncias contendo o cromóforo 4-eno-3-ona foram reveladas 1) Com soluto de alcoólico de 2,4-dinitrofenilhidrazina 2) Fluorescência à luz U. V. num alvo coberto com a substância fluorescente Ciba-S5.

As substâncias contendo o cromóforo 1,4-dieno-3-ona revelaram-se unicamente pelo método 2.

Os cromatogramas são representados esquematicamente, conservando as distâncias as suas posições relativas.



- 1 — androsta-1,4-dieno-3,17-diona.
 2 — bisdeidrotetolactona.
 3 — tetolactona.
 4 — Fracção ácida de oxidação de androsta-1,4-dieno-3,17-diona.

SUMMARY

A new synthesis of bis-deidrotetolactone by chemical route is described, based in the oxidation by peracids of a 17-cetosteroid without protection of double bonds in the ring A of the molecule. The relative stability toward the peracids of the group 1,4-diene-3-one is established at the same time.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PETERSON et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5769 (1953).
 (²) FRIED, THOMA et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5764 (1953).
 (³) FRIED, THOMA: U. S. 2768,928 (1956 Olin Mathieson).
 (⁴) FRIED, THOMA: U. S. 2744,120 (1956 Olin Mathieson).
 (⁵) SEGALOF A., MEYER K. K., RONGONE E. L., WEETH J. B. e CUNINGHAM, M. E.: *Cancer* **15**, 606 (1962).
 (⁶) LEVY H. e JACOBSEN R. P.: *J. Biol. Chem.* **171**, 71 (1947).
 (⁷) NASCIMENTO J. M. e SILVA M. L.: *Rev. Port. Farm.* **12**, 465 (1962).

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL NOTA COMPARATIVA SOBRE OS MÉTODOS DO CLORETO FÉRRICO E DE BLOOR

ALBANO ILÍDIO RAMOS MORGADO
Alferes - Farmacêutico

A determinação de colesterol no sangue é um dos assuntos mais estudados dentro do ramo da química clínica, e que se pode averiguar pelo grande número de trabalhos existentes e de investigadores que ao problema se dedicaram. Não têm estas notas a pretensão de resolver qualquer problema mas apresentar uma série de determinações tendentes a comparar dois dos muitos métodos que podem ser utilizados para o efeito — o Método de Klungsoyr, Clors e colaboradores, conhecido algumas vezes por Método do Percloroeto e o Método de Bloor.

1 — É método clássico para a determinação do colesterol no sangue o de Grigault que se baseia, como alguns outros, na reacção de Liebermann-Buchard. São exemplos os propostos por PATRICK V. FERRO, ANNA BELL HAN, R. CROKETT, etc.

É curioso notar que, se alguns métodos começam por fazer uma extracção do colesterol após ruptura das ligações lipo-protídicas (Grigault), outros fazem as determinações directas, partindo imediatamente para a reacção corada (Zack, Zlatkis e Boyle).

Quanto aos métodos baseados na reacção de Liebermann-Burchard, deve dizer-se que se por um lado há uma certa especificação de reacção para o colesterol, por outro surgem inconvenientes como os citados por P. M. TRAVERSE, G. H. LAVERGNE e M.^{me} DEPRAITIÈRE (1). Entre eles temos as diferenças de intensidade e velocidade de reacção condicionadas quer pela proporção e pureza dos reagentes, quer pela temperatura e relação entre o colesterol livre e esterificado.

Pode, em muitos casos, interessar a determinação do colesterol livre para, a partir da taxa de colesterol total, sabermos o esterificado. Para esse fim, somente dois processos são válidos — o método de precipitação com digitonido e o método de separação por cromatografia sobre alumina, proposto por J. AGNERAY, F. PUISIEUX e P. C. DOURIS (2).

2 — Mas voltemos à finalidade a que nos propusemos — a comparação dos métodos de Klungsoyr, Clors e colaboradores, e de Bloor.

Notemos que qualquer destes métodos se baseiam em determinações colorimétricas e que o aparecimento destas colorações parece dever-se a fenómenos de condensação molecular. Estas reacções desenvolvem-se, possivelmente, do modo seguinte: a acção dum desidratante, por exemplo o ácido sulfúrico, promove a formação de duplas ligações

na molécula do colesterol. Estas duplas ligações, permitindo a condensação molecular, originam a coloração que se desenvolve. Daqui a importância dos tempos a que são feitas as leituras, visto que estas reacções se processam durante várias horas, e da igualdade de condições de trabalho.

Da série de comparações feitas surgiram-nos algumas notas e resultados que passamos a expor:

3 — Método de Klungsoyr, Clors e colaboradores

Reagentes:

1. Mistura acetato de etilo-álcool etílico, (1:1);
2. Acetato de etilo;
3. Solução padrão base: solução de colesterol a 100 mg/100 ml de álcool a 96°;
4. Solução padrão para uso: 10 ml da precedente num balão de 100 ml. Adicionar 40 ml de álcool etílico e perfazer o volume com acetato de etilo. Conservar bem fechado com rolha de vidro ou de polietilene;
5. 10 g de cloreto férrico, dissolvidos em 100 ml de ácido acético glacial;
6. Diluir 2 ml da solução anterior até 200 ml com ácido sulfúrico concentrado.

Técnica:

Num tubo de centrifuga, juntar a 5 ml da solução 1, 0,2 ml de soro, medidos com pipeta própria que se deve limpar externamente com algodão antes da adição. Lavar a pipeta com o líquido contido no tubo, aspirando esse mesmo líquido algumas vezes, tendo o cuidado de não o deixar passar acima da marca superior da pipeta.

Tapar o tubo com rolha de cortiça envolvia em plástico ou celofane. Misturar, agitando vigorosamente.

Centrifugar durante 10 minutos. Transferir 1 ml de líquido centrifugado para um matrás apropriado. Medidos com buretas, adicionar 5 ml de acetato de etilo e 4 ml do reagente 6, estes deitados contra as paredes de modo a não misturar. Misturar então, por rotação. Deixar arrefecer cerca de 30 minutos. Fazer leituras no fotocolorímetro a 490 m μ .

Paralelamente, fazer ensaio a branco, substituindo o centrifugado por mistura de acetato de etilo-álcool etílico e procedendo como anteriormente.

Determinar as concentrações de colesterol a partir das leituras efectuadas, usando a curva padrão.

Este método, muitas vezes chamado do percloreto, começa por fazer uma depuração do sangue, precipitando as suas proteínas; esta depuração, que se consegue utilizando álcool absoluto, tem por finalidade evitar que as moléculas proteicas, de grandes dimensões em relação às do colesterol, impeçam que este seja completamente doseado. A operação é feita em tubo de centrifuga, devendo agitar-se violentamente para que a separação seja completa. A uma parte do líquido isento

de partículas por centrifugação, junta-se determinada quantidade de anidrido acético e solução de cloreto férrico em ácido sulfúrico p. a.. Após esta operação desenvolve-se uma coloração que nos permite determinar as concentrações do colesterol. As leituras devem fazer-se meia hora depois, tempo óptimo para o efeito.

a) — Para pôr em funcionamento este método efectuámos treze ensaios, visando diferentes aspectos do problema.

Começámos por preparar padrões cujas concentrações eram, respectivamente, 5, 9, 10, 11, 12, 15 e 20 mg%, que correspondem a 1.25, 2.25, 2.50, 2.75, 3.00, 3.75 e 5.00 g de colesterol por litro de sangue.

Ou seja, para passarmos as concentrações de colesterol das soluções padrão para soro de sangue, temos que multiplicar aquelas por 2.5. Vejamos como aparece este factor: pela técnica, juntamos a 5 ml duma mistura álcool etílico-acetato de etilo (1:1), 0.2 ml de soro. Desta diluição retirámos 1 ml. Portanto:

Se em 5 ml existem 0.2 ml de soro

» 1 ml » » ml » »

$$x = 0.04 \text{ ml}$$

Se por hipótese tivermos uma solução contendo 10 mg de colesterol em 100 ml de mistura, 1 ml desta solução conterá 0.1 mg de colesterol. Exprimindo em gramas por litro de soro, temos:

$$0.1 \times \frac{1000}{0.04} = 2.5 \text{ g/l}$$

Assim aparece o factor 2.5.

Seguindo a técnica, determinámos as densidades ópticas respectivas, construindo, para maior rigor, a curva de regressão a fim de obter a curva do método.

b) — Determinação da curva de regressão

Observemos o quadro seguinte:

x <> C	y <> D	Δx	Δy	Δx^2	Δy^2	$\Delta x \cdot \Delta y$	D val. c.
1.25	0.09	1.68	0.15	2.2224	0.0225	0.2520	0.08
2.25	0.17	0.68	0.07	0.4624	0.0049	0.0476	0.17
2.50	0.21	0.43	0.03	0.1849	0.0009	0.0129	0.199
2.75	0.22	0.18	0.02	0.0324	0.0004	0.0036	0.22
3.00	0.26	0.07	0.02	0.0049	0.0004	0.0014	0.24
3.75	0.30	0.82	0.6	0.6724	0.0036	0.0492	0.31
5.00	0.42	2.07	0.18	4.2849	0.0324	0.3726	0.43
$\bar{x}=2.93$	$\bar{y}=0.24$	—	—	$\Sigma x^2=7.8643$	$\Sigma y^2=0.0651$	$\Sigma \Delta x \cdot \Delta y=0.7393$	

Δx — afastamento da concentração de cada padrão em relação à concentração média \bar{x} ;

Δy — afastamento das densidades ópticas em relação à densidade óptica média y .

Depois de determinados os afastamentos Δy e Δx , determinámos Δx^2 e os produtos $\Delta x \cdot \Delta y$. Finalmente, determinámos os respectivos somatórios. ,

A curva que se deve obter tem, como equação geral, a expressão:

$$D = a + bC$$

Esta é, como se sabe, a equação geral duma recta. Teremos que determinar a e b para que, a partir das concentrações, possamos determinar as densidades ópticas respectivas. Obtidos estes valores, substituímo-los na equação acima e obteremos os correspondentes valores de D . Para determinar b usamos a expressão:

$$b = \frac{\sum \Delta x \cdot \Delta y}{\sum \Delta x^2}$$

Conhecido o valor de b , determinámos a da equação abaixo em que entramos com as médias de D e C .

$$D = a + bC$$

c) — *Resultados*: Os resultados a que chegámos no decorrer da prática deste método, foram:

1. A estabilidade da cor obtida subsiste, pelo menos, durante uma hora;
2. Um padrão preparado a partir duma solução mãe, mantém a sua concentração pelo menos durante vinte dias.

d) — Repetimos, depois, o ensaio a fim de verificar se a junção de uma quantidade conhecida de colesterol (da ordem dos 0.5 g) a um soro já doseado era acusada na quantidade imposta. Obtivemos resultados positivos com 90 % de reproductibilidade.

4 — Método de Bloor

Reagentes:

1. Mistura álcool-éter — misture 3 volumes de álcool etílico absoluto (U. S. P.) e 1 volume de éter anidro, isento de peróxido (A. C. S.);
2. Clorofórmio anidro, (A. C. S.);
3. Anidrido acético, (A. C. S.);
4. Ácido sulfúrico concentrado (A. C. S.).

Técnico:

Coloque num balão volumétrico fechado, de Pirex, 40 ml da mistura álcool-éter (3). Adicione, lentamente, agitando, 0,5 ml de sangue total. Deixe em repouso durante 1 minuto: aqueça, até ferver, em banho de água.

Arrefeça à temperatura ambiente e dilua a 50 ml com a mistura álcool-éter. Misture; filtre através de papel de filtro de grau apropriado. Evapore 25 ml do filtrado, deitando-o num prato quente. Extraia o colesterol do resíduo com clorofórmio isento de água (4). Ferva três porções de 3 ml de clorofórmio isento de água com resíduo e decante para uma proveta graduada. Repita duas vezes. Guarde o volume total de extractos que deve ser inferior a 5 ml, fervendo novamente, se necessário.

Dilua a 5 ml com clorofórmio isento de água.

Noutra proveta graduada, marcada BRANCO, coloque 5 ml de clorofórmio seco. Adicione a cada proveta 2 ml de anidrido acético e 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado (5). Misture invertendo as provetas várias vezes.

Com o branco no instrumento e com a escala de comprimentos de onda em 630 $m\mu$, marque 100 % de Transmitância. Exactamente aos 5 minutos, torne a colocar o branco com a amostra e leia.

Refira à tabela para determinar a concentração em mg de colesterol total, em 100 ml (6).

a) — Este método, a usarem-se os reagentes indicados pela firma BAUSCH e LOMB, o que se torna, quase sempre, muito difícil não exige curva padrão visto que, com as leituras efectuadas, entramos em tabelas fornecidas pela casa acima citada, obtendo-se a correspondente concentração de colesterol. No entanto, dada a dificuldade a que atrás nos referimos, é de aconselhar sempre a construção da curva padrão do método.

b) — *Resultados:* Sobre esta técnica observámos o seguinte:

1. A estabilidade da cor que se produz é muito pequena. As leituras devem ser feitas, exactamente, aos 5 minutos;
2. Os padrões diluídos mantêm-se, pelo menos, durante 10 dias.

5 — Comparação dos métodos obtidos:

a) — Ao pensarmos comparar estes dois métodos para determinação de colesterol no sangue, tivemos em mente estudar o assunto de modo a certificar-nos sobre dois pontos, fundamentais no nosso caso:

1. Verificar se os dois métodos dariam ou não resultados concordantes, o que nos permitiria utilizar aquele que maior facilidade de técnica apresentasse;

2. Verificar até que ponto uma junção ulterior de uma quantidade conhecida de colesterol era denunciada na prática dos métodos, o que nos permitiria avaliar das suas sensibilidades.

Foi-nos dado averiguar que, dum modo idêntico nos dois casos, as condições em que se trabalha tem uma influência notável no bom resultado dos métodos. Assim para que dentro do mesmo método, dois ensaios sejam comparáveis, é essencial processá-los nas mesmas condições de temperatura e agitação, usar reagentes p. a. e, se possível, do mesmo lote.

b) — Eis, finalmente, as conclusões a que chegámos:

1. O método do cloreto férrico é mais rápido e de prática menos complicada, evitando a evaporação à secura que no método de Bloor se conduz com o auxílio do vazio;

2. Os resultados obtidos no mesmo soro, utilizando as duas técnicas, são idênticas como podemos verificar no quadro de resultados que se segue:

Experiências	Concentrações em g/1000	
	Método de Bloor	Método do Cl_2Fe
Sangue n.º 01	1.43	1.35
Sangue n.º 02	1.35	1.45
Sangue n.º 03	1.92	2.00
Sangue n.º 04	1.39	1.45
Sangue n.º 05	1.77	1.80

3. Em ambos os métodos é fundamental a agitação violenta no desprendimento de proteínas pelos motivos já apontados;

4. O método do cloreto de ferro dá economia de reagentes e de substância a analisar, condição que não nos parece ser, de modo algum, de desprezar.

RESUMO

O A. faz um estudo comparativo do doseamento de colesterol no sangue pelos métodos do cloreto de ferro e de Bloor e conclui ser de preferir o primeiro pela economia não só de tempos mas também de reagentes e amostra.

SUMMARY

The A. make a comparative study between the iron hydrochloride and the Bloor methods of the cholesterol assay in the blood and they conclude we must prefer the first one for not only saving time but also reagents and the sample itself.

BIBLIOGRAFIA

- (1) «Choix de Techniques de Biochimie Clinique»—Guy Devaux, Gauthier-Villars e Cie. Éditeur, Paris.
- (2) MATTEW Y LYNCH: «Medical Laboratory Technology»—W. B. Saunders, Company, Philadelphia and London, 1963.
- (3) TRAESE, P. M., de LAVERNE e M.^{me} DEPRAITIÈRE: *Ann. Biol. Clin.*, **15**, 257 (1957).
- (4) AGNERAY J., PUISEUX F. e DOURIS P. C.: *Ann. Biol. Clin.*, **16**, 563 (1958).
- (5) «Practical Clinicalbiochemistry»:—Harold Varley William Heinemann—Medical Books Ltd. (1954).
- (6) BLOOR: *Biol. Chem.*, **24**, 227 (1916).



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

IDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DA BENZODIAZEPINONA (*)

MARIA AMÉLIA PAIVA ALVES
Licenciada em Farmácia

Sendo a benzodiazepinona um novo agente psicotrópico, tal como o clordiazepóxido, derivado da benzodiazepina e de toxicidade muito reduzida, pareceu-nos de interesse a sua industrialização.

Com esse objectivo procedemos ao estudo analítico do composto, focando, sobretudo, as reacções de identificação, métodos de dosagem e controle da forma farmacêutica cápsulas.

Quimicamente é a 7-cloro-1-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina-2(1H)-ona e foi sintetizada por STEMBACH e REEDER.

Apresenta-se sob a forma de um pó branco, cristalino, alterável à luz e de sabor amargo, com o ponto de fusão 122-124°. Insolúvel na água fria, mas bastante solúvel em água quente. Solúvel no álcool de 95°, em dioxano e clorofórmio. Insolúvel no éter de petróleo. Cora ligeiramente de amarelo pela acção do ácido clorídrico.

Não possuíamos outros elementos de caracterização por o produto não se encontrar ainda descrito nos livros da especialidade.

Assim, começámos por fazer o seu estudo espectrofotométrico no ultravioleta a partir de soluções a 0,5 mg% respectivamente em álcool de 95° e ácido clorídrico N/10 (Fig. 1).

Como se pode verificar pelas curvas juntas, o produto apresenta, nestes solventes, espectros característicos mas um pouco diferentes.

No álcool de 95° apresenta um máximo a 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$) sendo este deslocado no HCl N/10 para 245 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1050$).

Para a identificação e dosagem adoptámos o espectro em meio alcoólico, visto a densidade óptica ser mais elevada neste solvente.

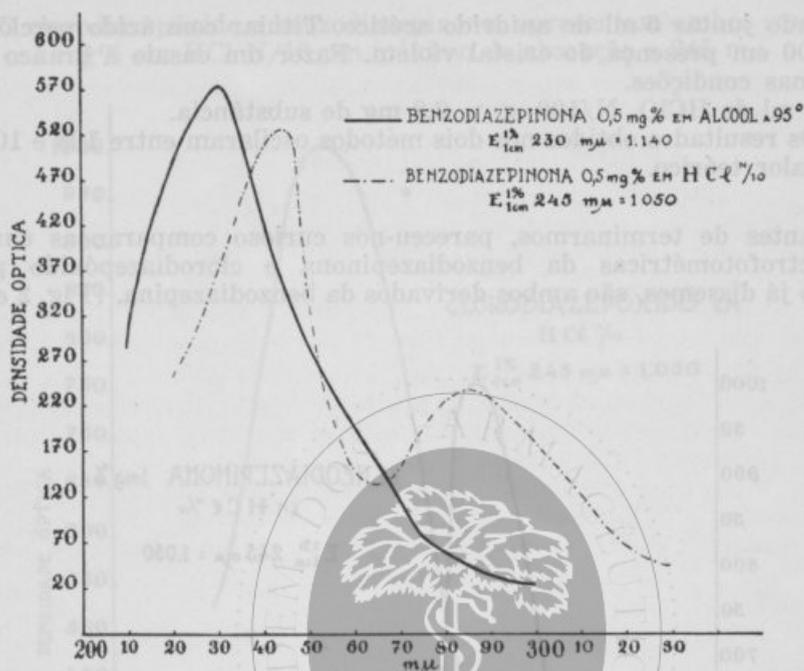
Ensaíamos ainda a seguinte reacção de identificação:

A substância (0,1 g) dissolvida em ácido clorídrico diluído a 50% (5 ml) precipita pela adição de igual volume de ferrocianeto de potássio a 5%.

Esta reacção baseia-se na presença da função amina terciária, que precipita, em meio ácido, com o ferrocianeto de potássio, por formação dum ferrocianeto ácido de amónio.

Ainda baseados na presença da função amina ensaíamos a titulação em meio não aquoso, pois como sabemos, as aminas, podem, por dissolução em ácido acético glacial ser tituladas com o ácido perclórico.

(*) Comunicação apresentada nas II Jornadas Farmacêuticas Portuguesas, Coimbra, Junho de 1963.



Adoptámos a seguinte técnica:

Dissolver 250 mg em 25 ml de ácido acético 99-100%, juntar 5 ml de anidrido acético e titular com HClO₄ N/10 em presença do cristal violeta. Fazer um ensaio a branco.

1 ml de HClO₄ N/10 < > a 0,028474 de benzodiazepinona.

Os resultados obtidos foram sensivelmente iguais nos dois métodos oscilando entre 99-100%.

Concluimos assim poder aplicar na dosagem da substância o método espectrofotométrico ou titulação em meio anidro pois ambos conduzem a resultados aceitáveis.

da Ordem dos Farmacêuticos

Na dosagem do medicamento apresentado sob a forma de cápsulas, qualquer dos métodos ensaiados nos deu satisfação, procedendo do seguinte modo:

1. — Dosagem espectrofométrica:

Deitar o conteúdo de 10 cápsulas num balão graduado de 200 ml, dissolver em álcool de 95° e completar o volume. Filtrar, tomar 5 ml e completar o volume de 100 ml com álcool de 95° (diluição a 0,75 mg%).

Determinar a extinção deste soluto a 230 m μ .

2 — Titulação em meio anidro:

Tomar o conteúdo de 30 cápsulas num balão graduado de 50 ml, dissolver em ácido acético e perfazer o volume. Filtrar e a 25 ml do

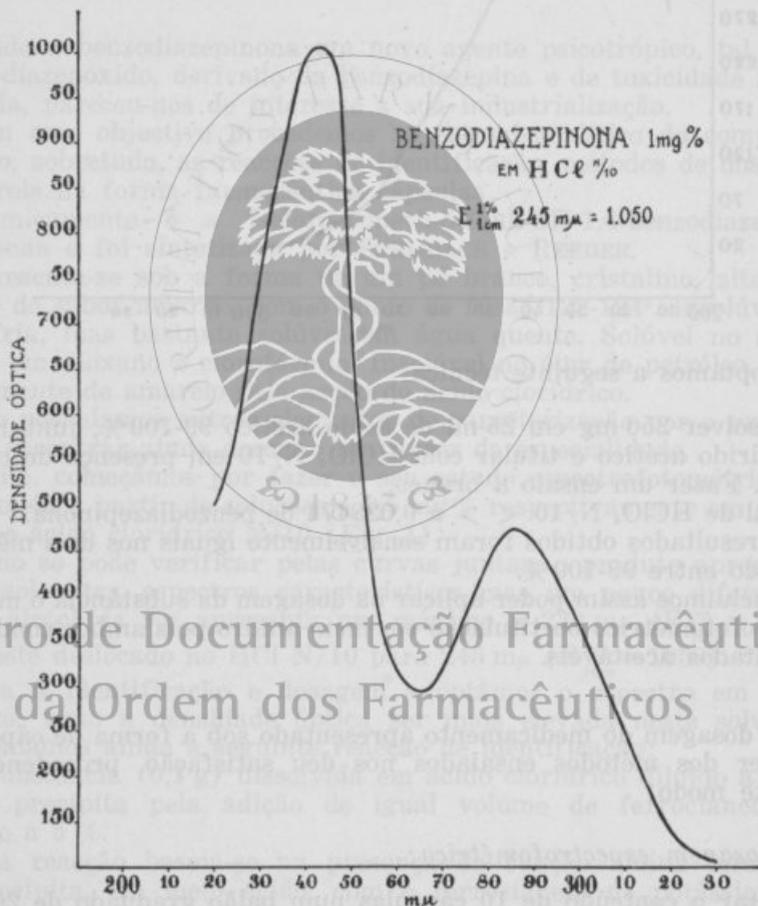
filtrado juntar 5 ml de anidrido acético. Titular com ácido perclórico N/100 em presença do cristal violeta. Fazer um ensaio a branco nas mesmas condições.

1 ml de HClO_4 N/100 \leq 2,8 mg de substância.

Os resultados obtidos nos dois métodos oscilaram entre 105 e 106% do valor teórico.

*

Antes de terminarmos, pareceu-nos curioso comparar as curvas espectrofotométricas da benzodiazepinona e clorodiazepóxido pois, como já dissemos, são ambos derivados da benzodiazepina. (Fig. 2 e 3).

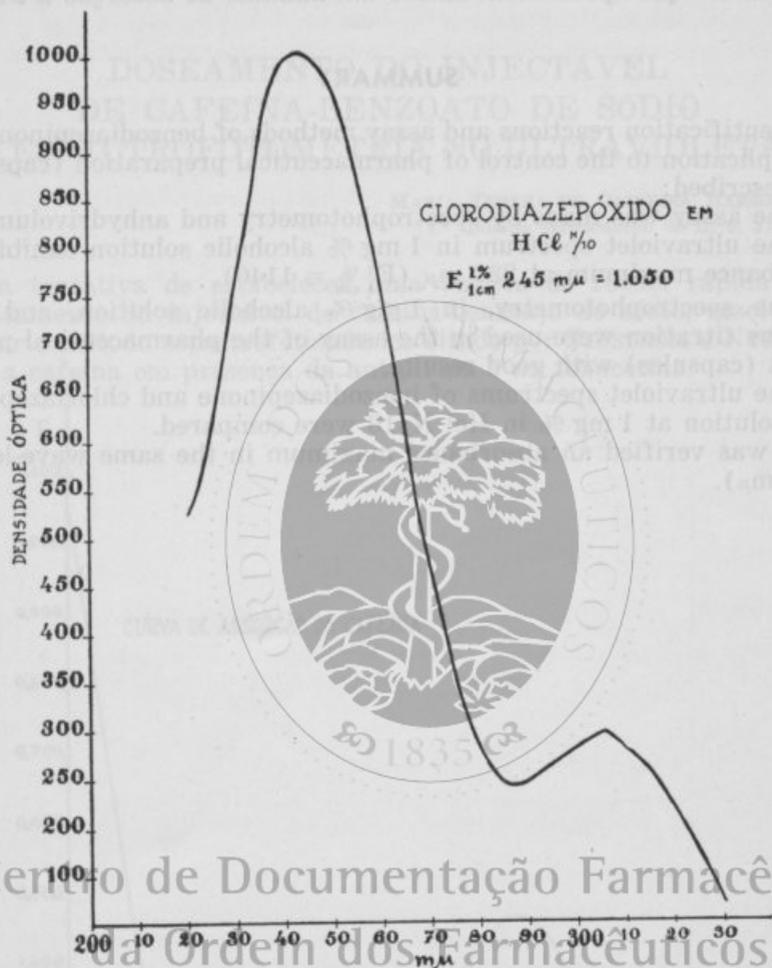


O clorodiazepóxido apresenta em solução a 1 mg% em HCl N/10 um máximo a 245 $\text{m}\mu$.

Começamos por obter com a benzodiazepinona valores aproximadamente iguais até 245 $\text{m}\mu$ comprimento de onda em que a benzodiazepinona apresenta, precisamente, o seu máximo de absorção.

A partir deste comprimento de onda verifica-se uma descida brusca.

O clordiazepóxido e benzodiazepinona, apresentam ambos em solução a 1 mg% em HCl N/10 um máximo de absorção a 245 m μ .



CONCLUSÕES

Dos ensaios efectuados concluímos:

- 1) A benzodiazepinona precipita, em meio ácido, com o ferrocianeto de potássio.
- 2) O aspecto no U. V., em solução alcoólica, é característico, apresentando um máximo a 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$).
- 3) A dosagem pode ser efectuada por espectrofotometria e anidrovolumetria.
- 4) Qualquer dos métodos conduz a resultados satisfatórios, no controlo da forma farmacêutica cápsulas.

5) Comparando as curvas espectrofotométricas da benzodiazepinona e clordiazepóxido, em solução a 1 mg% em ácido clorídrico N/10, verificamos que apresentam ambos um máximo de absorção a 245 m μ .

SUMMARY

Identification reactions and assay methods of benzodiazepinone and its application to the control of pharmaceutical preparation (capsules) are described:

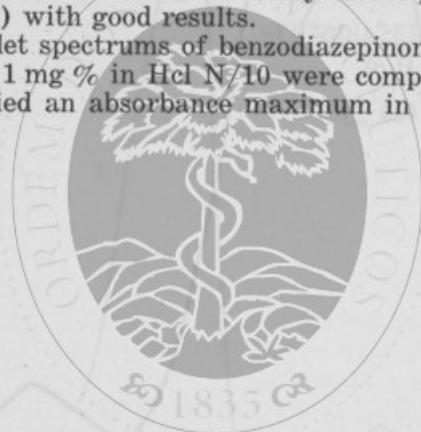
The assay was made by spectrophotometry and anhydrivolumetry.

The ultraviolet spectrum in 1 mg % alcoholic solution exhibits an absorbance maximum at 230 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1140$).

The spectrophotometry, in 1 mg % alcoholic solution, and non-aqueous titration were used in the assay of the pharmaceutical preparation (capsules) with good results.

The ultraviolet spectrums of benzodiazepinone and chloriazepoxide in a solution at 1 mg % in Hcl N/10 were compared.

It was verified an absorbance maximum in the same wave-length (245 m μ).



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

DOSEAMENTO DO INJECTÁVEL DE CAFEÍNA-BENZOATO DE SÓDIO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA (*)

MARIA TERESA DE OLIVEIRA BARROSA

1.º Químico farmacêutico do H. S. J.

Na tentativa de estabelecer uma técnica de rotina rápida para o doseamento do injectável de cafeína-benzoato de sódio, resolvemos ensaiar o método espectrofotométrico citado por SJÖSTRÖM e NYKÄNEN para a cafeína em presença da antipirina e da fenacetina.

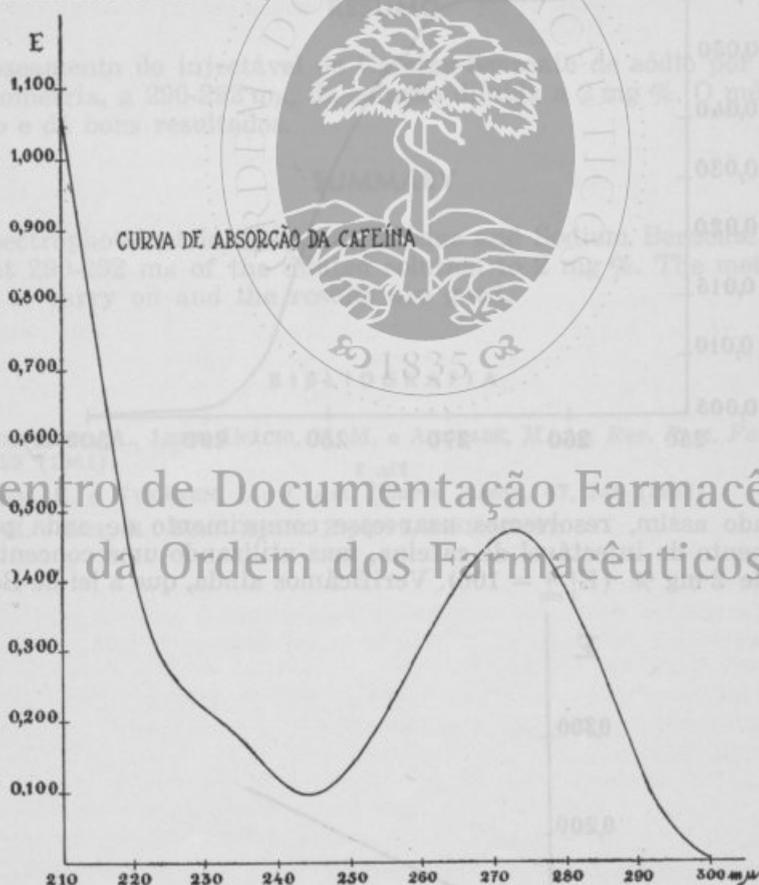


Fig. 1

(*) Trabalho apresentado nas II Jornadas Farmacêuticas Portuguesas — Junho de 1963.

Começámos por verificar a curva de absorção para a cafeína numa solução aquosa a 1 mg% (Fig. 1). Partimos duma substância seca até peso constante e com ela obtivemos o coeficiente de extinção específico de 510, situado a 272-273 $m\mu$ (fenda 0,4).

Seguidamente determinámos a curva de absorção para o benzoato de sódio (Fig. 2) numa solução aquosa com 1,4 mg% (concentração com que se apresenta no injectável quando o diluímos de tal modo, que a concentração final de cafeína seja de 1 mg%). Constatámos, assim, que o benzoato de sódio a 1,4 mg% apresenta valores de extinção muito baixos desde 250 $m\mu$ até cerca de 270 $m\mu$ e, a partir deste valor, a curva começa a descer rapidamente até 292 $m\mu$, onde praticamente não absorve ($E = 0,005$).

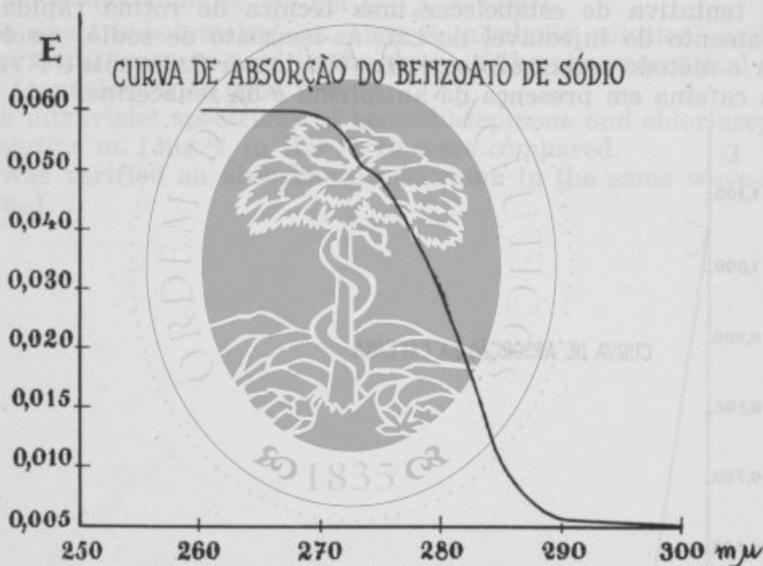


Fig. 2

Centro de Documentação Farmacêutica

Sendo assim, resolvemos usar esse comprimento de onda para o doseamento do injectável de cafeína, mas utilizando uma concentração final de 2 mg% ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 100$). Verificámos ainda, que a lei de Beer se

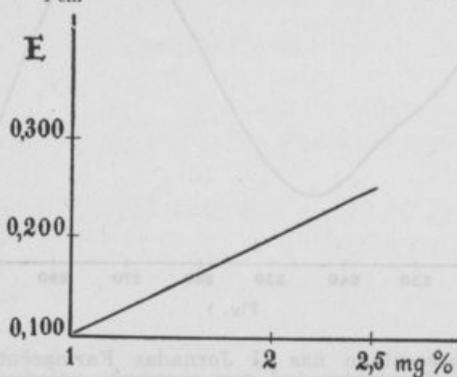


Fig. 3

cumpria para a cafeína nas concentrações de 1 mg %, 2 mg %, 2,5 mg % a 292 m μ (Fig. 3) e, do mesmo modo, com o benzoato de sódio nas concentrações de 1,4 mg %, 2,8 mg % e 3,5 mg %.

Da posse destes dados, aplicámos a técnica ao doseamento do injectável, procedendo do seguinte modo: 2 ml da solução injectável são diluídos até 1000 ml, com água; desta diluição tomámos 10 ml para balão aferido, completando 250 ml com água. Lemos a 290 e 292 m μ , usando como branco água e ainda solução de benzoato de sódio a 2,8 mg %, obtendo os mesmos valores de densidade ótica.

Para o injectável encontrámos, em diferentes ensaios e diferentes amostras, valores entre 95-104 % do teórico. Realizámos, ainda, ensaios de recuperação, tendo obtido valores de 98,6 %-99 %-101 %.

Trabalho realizado num espectrofotómetro Beckman DU, modelo G 2400 com uma Cafeína anidra Katjwick e Benzoato de sódio Bayer.

RESUMO

Doseamento do injectável de Cafeína-benzoato de sódio por espectrofotometria, a 290-292 m μ , da solução diluída a 2 mg %. O método é rápido e dá bons resultados.

SUMMARY

Spectrophotometric assay of Caffeine and Sodium Benzoate Injection at 290-292 m μ of the diluted solution to 2 mg %. The method is quick to carry on and the results are good.

BIBLIOGRAFIA

MARQUES LEAL, A., LEITE INÁCIO, M. M. e ANDRADE, M. A.: *Rev. Port. Farm.*, **11**, 359 (1961).

SJÖSTRÖM, E. e NYKÄNEN, L.: *J. Am. Pharm. Assoc.*, **47**, 248 (1958).

RINK, M. e LUX, R.: *Deut. Apoth. Ztg.*, **99**, 1051 (1959).

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

REVISÕES DE CONJUNTO

NOVAS PERSPECTIVAS DA ELECTROFORESE EM SUPORTE INERTE (*)

ANTÓNIO PINHO DE BROJO

Assist. da Esc. de Farm. de Coimbra

A electroforese tem constituído, indiscutivelmente, um método analítico através do qual muito se tem progredido tanto no domínio da química como no da biologia. Com efeito, raríssimas são as publicações científicas que não dedicam, mensalmente, várias páginas a trabalhos realizados com esse novo método, e, a tal ponto, que o investigador que delas pretenda obter conclusões seguras, de fácil reprodução, se vê em sérias dificuldades para identificar os seus próprios resultados com os de outros Autores. É assim que, no domínio da biologia e da bioquímica, os resultados da análise electroforética só raramente constituem elemento informativo seguro e decisivo para a resolução dos problemas analíticos concernentes. É esta uma das razões que melhor explicam a discordância tão frequente entre as conclusões dos diversos trabalhos, dirigidos, todos, afinal, no mesmo sentido de investigação. Qual desses Autores terá atingido a verdade se cada um demonstra o que afirma? Quantas vezes se farão classificações precipitadas sobre a idoneidade científica deste ou daquele Autor só pelo facto de não se obterem conclusões concordantes com as que se pretende verificar, quando se seguiu a «pari passu» o método por eles descrito?

Tentaremos, pois, analisar alguns dos problemas mais salientes da electroforese em suportes porosos e pôr em destaque os progressos mais importantes que neste domínio têm sido alcançados nos últimos anos.

*
* * *

O emprego da corrente eléctrica na separação de compostos ionizáveis data já dos fins do século passado, nas mãos dos que, com inteira

(*) Lição proferida no Sindicato Nacional dos Farmacêuticos (Março de 1963).