

nio; aqueça a mistura em banho de água por 5 minutos; junte 25 ml de solução decinormal de azotato de prata, misture e aqueça de novo a banho de água, por 15 minutos, agitando frequentes vezes. Arrefeça, perfaça com água o volume de 200 ml e certifique em seguida, ou filtre decorridas pelo menos 12 horas.

Rejeite os primeiros 20 ml do filtrado ou do centrifugado e a 100 ml do restante, junte 5 ml de ácido azótico, 2 ml de solução sulfato férrico amoniacal e solução decinormal de sulfocianato de amónio até que o líquido adquira coloração rósea - persistente.

Conhecido o número n de ml gastos de solução decinormal de sulfocianato de amónio, calcule a percentagem multiplicando a diferença $(25 - n)$ por 2,683.

Ao efectuar os ensaios verificámos que o produto não se dissolve em água naquelas proporções, na primeira parte de qualquer dos dois ensaios e por isso entendemos que se deve pôr «misture» e não dissolva. Na técnica argentimétrica entendemos que se deve eliminar a centrifugação e que a filtração deve ser feita logo meia hora após a precipitação, pois os resultados não são melhores, se se deixa repousar as 12 horas.

Os resultados obtidos que se apresentam no quadro I comparativamente com os de técnica anidrovolumétrica acham-se compreendidos entre 47,6 e 47,7 (para a difenidramina) e 54,9 e 55,1 (para a 8-cloroteofilina).

2 — ANIDROVOLUMETRIA

As técnicas que utilizámos foram exactamente as aconselhadas pelos autores holandeses (1).

a) Difenidramina

Pesar rigorosamente 0,75 g de dimenidrinato, dissolver em 40 ml de clorofórmio ou ácido acético anidro, juntar 3 gotas de solução a 0,5 % de α -naftolbenzina em ácido acético anidro e titular com solução decinormal de ácido perclórico até viragem.

1 ml ClO_4H 0,1N \ll 25,54 mg de difenidramina. Fizemos os ensaios experimentando a dissolução em clorofórmio e em ácido acético e, se bem que os resultados fossem idênticos, achámos melhor empregar o colorofórmio visto a dissolução ser muito mais rápida do que com o ácido acético, pois com este necessitámos aquecer para a dissolução ser total.

Com qualquer dos dissolventes a viragem é nítida (amarelo claro para verde claro).

b) — 8 - Cloroteofilina

Pesar rigorosamente 0,75 g de dimenidrinato, dissolver em 40 ml de clorofórmio ou 30 ml de piridina, juntar 4 gotas de solução a 0,1% de azul de timol em metanol e titular com solução decinormal de metóxido de sódio até viragem (do amarelo claro ao azul claro).

1 ml de solução 0,1 N de metóxido de sódio \ll 21,46 mg de 8-cloroteofilina.

Feitos os ensaios com duas amostras obtivemos resultados de acordo com o exigido pela Farmacopeia Americana (entre 44 e 47%) verificando que a dissolução em clorofórmio é fácil ao passo que com a piridina é demorada, além do inconveniente do cheiro desagradável desta. A viragem em qualquer dos dissolventes é nítida.

Os resultados obtidos (quadro I) acham-se compreendidos entre 45,4 e 45,5% (para a 8-cloroteofilina) e entre 54,03 e 54,07% (para a difenidramina).

QUADRO I

Ensaio	Amostras	Difenidramina		8-Cloroteofilina	
		F. Am.	Anidrovol.	F. Am.	Anidrovol.
1	A	47,7	54,07	55	45,45
2	A	47,6	54,03	55,1	45,4
3	B	47,65	54,06	54,9	45,5
4	B	47,6	54,04	55	45,45

CONCLUSÕES

1) Tal como já havia sido referido pelos autores holandeses (*) a técnica do doseamento por anidrotitulumetria proposta por estes autores é não só mais rápida, mas conduz a resultados mais satisfatórios que o processo da Farmacopeia Americana que se havia proposto para a Adenda da Farmacopeia Portuguesa.

2) Aconselha-se de preferência a utilização do clorofórmio como dissolvente na dosagem de ambos os componentes do dimenidrato visto que este composto é menos solúvel no ácido acético e na piridina.

3) Propomos que na próxima Adenda da Farmacopeia Portuguesa seja incluído, em vez do método da Farmacopeia Americana, a anidrovolumetria usando o clorofórmio como dissolvente.

SUMMARY

It was performed a comparative study of the dosimetric method included on the U. S. P. XVI, who was proposed by the Portuguese Pharmacopeia Commission to the soon-to-publish Supplement (difenidramine's dosage by extraction in an alkaline solution and chloroteofiline's dosage argentometry) and the technique proposed by J. Meulenhof and J. J. M. Van Sonsbeek (difenidramine's anidrovolumetry with perchloric acid and chloroteofiline's anidrovolumetry with sodium methoxid, on the same sample).

The performed assays tend to confirm the Dutch author's conclusions about the advantages and above all the greater speed of this method that we think that ought to be included in the Portuguese Pharmacopeia with preference to the one proposed by the respective Commission.

BIBLIOGRAFIA

- (*) MEULENHOF J. e VAN SONSBEEK J. J. M.: *Pharm. Weekbl.*, 91, 453, 450 (1956).
 (†) Farmacopeia Americana XVI, 239.
 (‡) Informação da Comunicação da Comissão Permanente da Farmacopeia Portuguesa.

(Trabalho efectuado nos Serviços Farmacêuticos do H. S. M.)

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MÉTODOS DE DOSEAMENTO DA QUINETAZONA

M. MARGARIDA FERREIRA BRAGA

Técnica do Lab. da C. R. P. Q. F.

M. FERNANDA MAGALHÃES ILHARCO

Analista do Lab. da C. R. P. Q. F.

Depois da introdução na terapêutica de uma série de diuréticos de administração oral, derivados da benzotiadiazina, outros compostos de núcleo diferente, mas contendo igualmente um grupo sulfamídico, foram sintetizados e ensaiados clinicamente revelando idênticas propriedades farmacológicas.

ELLIOT COHEN e seus colab. (1) prepararam derivados de 7 cloro-6 sulfamil-4 (3H)-quinazolinona e de 7 cloro-6 sulfamil-1,2,3,4-tetrahydro-4 quinazolinona que diferem essencialmente dos da benzotiadiazina-1,1-dióxido por possuírem um carbonilo na posição 4 em vez do grupo SO₂ ligado ao núcleo.

A quinetazona, ou 7 cloro-2 etil-6 sulfamil-1,2,3,4-tetrahydro-4 quinazolinona, ou 7 cloro-2 etil-1,2,3,4-tetrahydro-4 oxo-6 sulfamil-quinazolinona, um dos compostos sintetizados por COHEN, foi introduzida em Portugal sob a forma farmacêutica de comprimidos, doseados a 50 mg.

Como a maioria dos trabalhos publicados referentes a este composto são de natureza clínica e pouco conhecidas as suas características analíticas, parecem-nos de bastante interesse o estudo de algumas das suas propriedades físico-químicas.

No intuito de identificar e dosear este sali-diurético, como matéria prima e nos comprimidos, traçámos os espectros de absorção no ultravioleta em etanol absoluto, em etanol a 95° ligeiramente alcalino e em soluções de hidróxido de sódio 0,1N, que apresentaram máximos e mínimos de absorção, característicos.

Verificámos também que os produtos resultantes da hidrólise alcalina de uma solução de quinetazona têm máximos e mínimos de absorção no ultravioleta, em comprimentos de onda não muito afastados dos da substância pura em soluções de hidróxido de sódio 0,1N, mas, muito embora, essa ligeira diferença não dá indicações para a identificação da substância, mostra, no entanto que, ao contrário da benzotiadiazina, o anel da quinazolinona é acentuadamente mais estável.

Traçámos os espectros do infra-vermelho, quer com a substância pura, quer com a quinetazona isolada dos comprimidos, numa dispersão em brometo de potássio, os quais apresentaram aspecto semelhante e característico. Podemos por este processo identificar com segurança o sali-diurético, em estudo.

Contrariamente ao que sucede com alguns diuréticos da benzotiadiazina, as soluções de quinetazona precipitam, em meio ácido, pelo iodo, dando possivelmente um derivado tetraiodado de adição, como parece provar a percentagem de iodo encontrada na análise do precipitado.

Este derivado iodado, no entanto, não é estável, nas condições ensaiadas, e daí terem falhado as nossas tentativas de empregar a reacção para o doseamento iodométrico da quinetazona, ficando apenas limitada à sua identificação.

Tentámos adaptar a técnica descrita por DE PAULIS e colab. (2) para o doseamento da hidroclorotiazida por anidrovolumetria, à determinação quantitativa da quinetazona. Apenas ensaiámos, como dissolvente desta substância, a butilamina normal, titulámos com metóxido de sódio 0,1N, usando o indicador azovioleta em solução benzénica, mas os resultados obtidos foram um tanto elevados (cerca de 110%) e discrepantes.

PARTE EXPERIMENTAL

1) CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A quinetazona é um pó branco, cristalino, inodoro, bastante solúvel em dime-tilformamida e nos solutos alcalinos diluídos, ligeiramente solúvel em etanol, metanol e acetona, muito pouco solúvel na água e em soluções ácidas.

A substância com que trabalhamos tinha um ponto de fusão de 249°-251° C, embora se cite também 248°-250° C (1) e 250°-252° C (2).

A determinação do espectro no infra-vermelho foi efectuada num aparelho Unicam, modelo SP-200, com prisma de cloreto de sódio, usando uma diluição de 1:149 em brometo de potássio. Pela observação deste espectro (Figura 1), verifica-se, por exemplo, a existência de duas bandas de absorção nas regiões de 1360-1290 cm^{-1} (7,30-7,70 μ) e 1170-1130 cm^{-1} (8,48-8,77 μ) características do agrupamento sulfonamida.

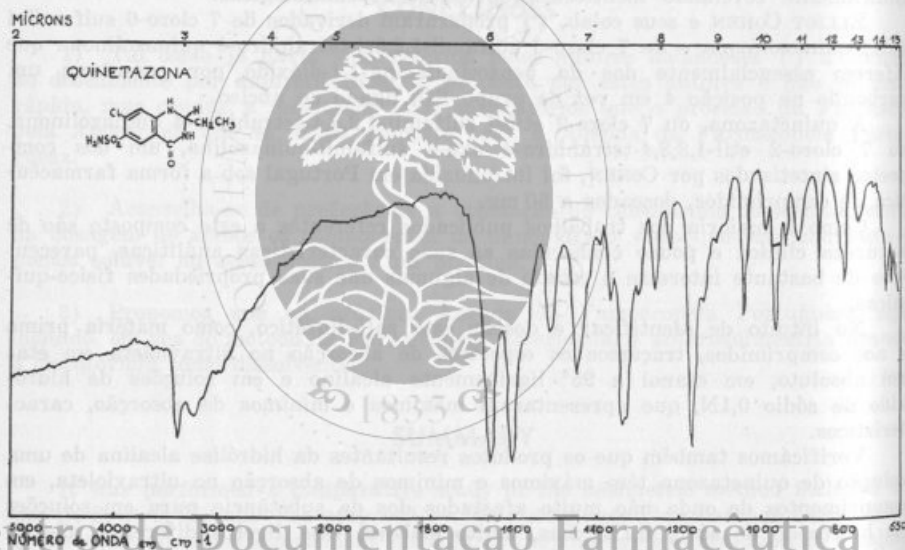


Fig. 1

Na região do ultravioleta estudámos os espectros da quinetazona desde 215-370 $m\mu$ em etanol absoluto, em etanol a 95° ligeiramente alcalino e ainda em hidróxido de sódio 0,1N.

Em soluções de etanol a 1 mg% registámos 3 máximos: a 233-234 $m\mu$, a 277-278 $m\mu$ e outro de menor importância a 343-344 $m\mu$; e 2 mínimos: a 256 $m\mu$ e a 302-303 $m\mu$ (Fig. 2).

— Dissolver 10 mg de quinetazona em 2 cm^3 de solução de hidróxido de sódio 0,5N, adicionar 5 cm^3 de solução de iodo 0,1N e rapidamente 2 cm^3 de ClHN.

Obtém-se ao fim de 10 minutos um precipitado castanho escuro que observado ao microscópio se apresenta como pequenas lâminas de cor castanha.

2) DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS

Como a anidrovolumetria empregando a n-butilamina conduziu a resultados um tanto elevados, apenas utilizámos nos ensaios quantitativos da quinetazona a espectrofotometria no ultravioleta.

Já anteriormente referimos, que as soluções deste sali-diurético em etanol apresentam um máximo característico em 277-278 $m\mu$, e neste comprimento de onda a *Lei de Beer* é seguida, como podemos verificar com soluções a 0,5 mg-1,0 mg-1,5 mg e 2,0 mg%, registando-se proporcionalidade entre as concentrações e as extinções lidas.

Para o doseamento da substância pura bastará, portanto, preparar uma solução em etanol absoluto a 1 mg% e ler a sua absorção a 277-278 $m\mu$.

Obtivemos para $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ o valor de 391.

Outra alternativa do método espectrofotométrico será:

— Dissolver a quinetazona em solução de hidróxido de sódio 0,1N, diluir convenientemente e fazer leituras em 269 $m\mu$ (máximo mais característico). O valor de $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ obtido foi de 273.

Também neste comprimento de onda e com várias concentrações do produto verificámos a *Lei de Beer*.

3) VERIFICAÇÃO DOS COMPRIMIDOS

c) Ensaio qualitativos

Tratar o pó de 5 comprimidos com 5 cm^3 de solução de hidróxido de sódio N e 25 cm^3 de etanol absoluto. Filtrar e ao filtrado adicionar 5,5 cm^3 de solução de ácido clorídrico N. Evaporar a solução alcoólica no vácuo, aquecendo ligeiramente (cerca de 40° C), até obter um pequeno volume de cerca de 5 cm^3 . Adicionar ao líquido resultante água destilada até se produzir abundante precipitado. Filtrar, lavar o precipitado com água destilada e secá-lo na estufa a 60°.

No precipitado pode determinar-se o ponto de fusão, o espectro no infra-vermelho, como se descreveu para a matéria prima, ou outras determinações qualitativas.

Aproveitando as soluções alcoólicas ou as soluções alcalinas, preparadas como se indica nas determinações quantitativas, pode também verificar-se na região ultra-violeta a identidade do espectro do princípio activo isolado dos comprimidos e do espectro traçado com a substância pura.

b) Ensaio quantitativos

Tal como se descreveu para a matéria prima o doseamento da quinetazona nos comprimidos foi realizado por nós pelos métodos espectrofotométricos, em meio alcoólico ou alcalino.

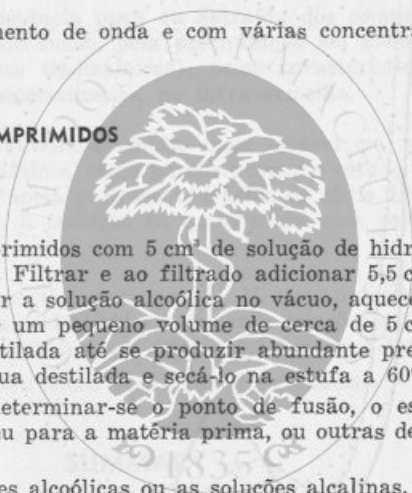
Embora tivéssemos obtido em ambos os métodos, resultados absolutamente concordantes, afigura-se-nos contudo, mais prático o meio alcalino, no qual a quinetazona é bastante mais solúvel, o que facilita a extracção do princípio activo do excipiente dos comprimidos.

A técnica por nós utilizada foi a seguinte:

Pulverizar 10 comprimidos, pesar uma quantidade de pó equivalente a 25 mg de quinetazona e tratar com solução de hidróxido de sódio 0,1N até completar o volume de 250 cm^3 . Filtrar e diluir ao décimo com soda da mesma normalidade.

Fazer leituras em 269 $m\mu$, considerando $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ igual a 273.

Como a quinetazona é só ligeiramente solúvel em etanol e tratando-se de uma sulfonamida, pensámos em facilitar a sua dissolução adicionando um pouco de solução de hidróxido de sódio ao álcool.



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

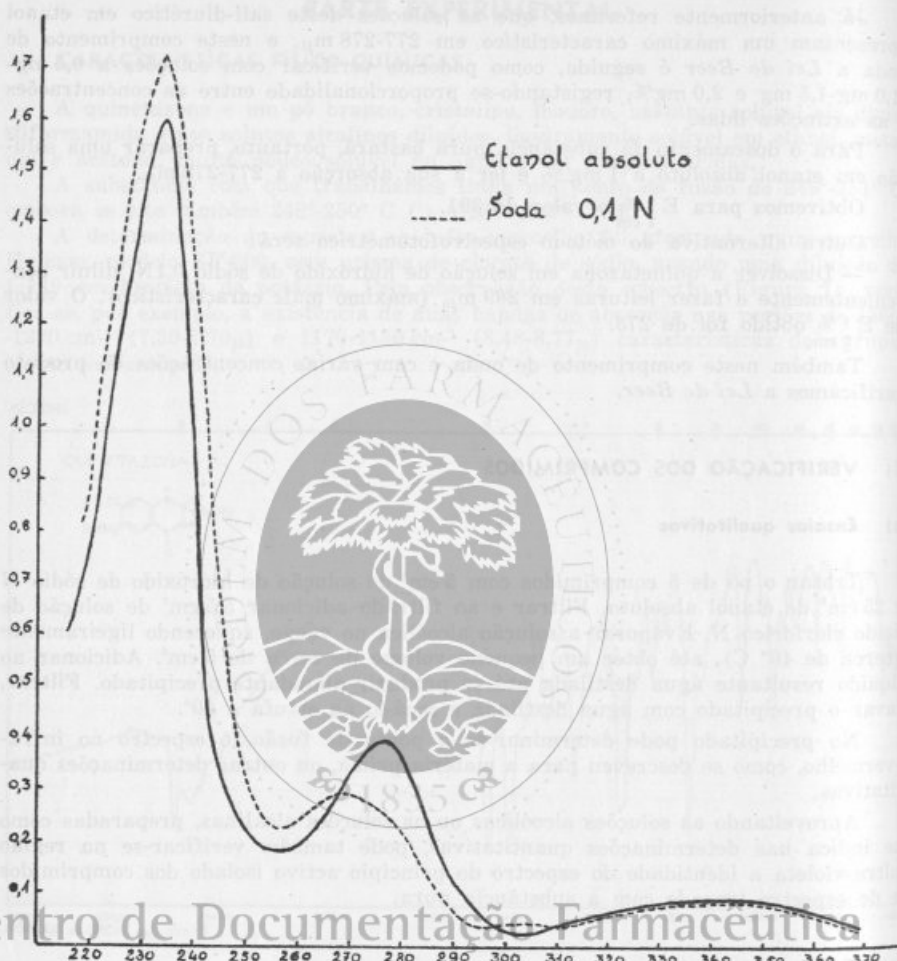


Fig. 2

Dissolvemos 10 mg de quinetazona em 1 cm³ de OHNa N e completámos o volume de 100 cm³ com etanol a 95°; a partir desta preparámos uma outra solução diluindo ao décimo com o mesmo etanol.

O espectro da solução assim obtida apresentou máximos e mínimos de absorção que se situam muito próximo dos encontrados no caso anterior, sendo o máximo mais característico a 275 ± 1 m_μ com E_{1 cm}^{1%} = 331.

A solução da quinetazona em OHNa 0,1N, diluída convenientemente, apresentou também três máximos: em 233-234 m_μ, em 269 m_μ e em 347-348 m_μ; mínimos em 255 ± 1 m_μ e numa larga zona de 297-302 m_μ (Figura).

Submetemos 10 mg de quinetazona à ebulição por 1 hora com 25 cm³ de OHNa 4N e diluimos a solução de modo a obter uma concentração final da substância a 0,5 mg% em OHNa 0,1N. A solução resultante revelou máximos a 226 m_μ, 262-263 m_μ e 314 m_μ e mínimos a 245 m_μ e 283-290 m_μ.

Tem interesse para a identificação de quinetazona o facto de ser precipitável pelo iodo em meio ácido. Propomos para esta reacção a seguinte técnica:

No caso de se utilizar como dissolvente o etanol absoluto deverá ter-se a precaução de agitar enèrgicamente a solução para se conseguir esgotamento completo do princípio activo. Nestas condições a leitura deve efectuar-se a $278\text{ m}\mu$, sendo o $E\text{ }1\%$ igual a 391.

1 cm

CONCLUSÕES

1) — A quinetazona, substância pura ou extraída dos comprimidos pode ser identificada pelo seu ponto de fusão, pela precipitação em meio ácido com iodo $0,1\text{N}$ (distinção dos diuréticos tiadiazínicos), pelas características espectrofotométricas no ultravioleta e, especialmente, no infravermelho.

2) — Este sali-diurético revelou-se muito mais estável em meio alcalino, do que os derivados benzotiadiazínicos, como parece provar o estudo comparativo dos espectros obtidos com a substância pura em hidróxido de sódio $0,1\text{N}$ e com a solução resultante do tratamento à ebulição da quinetazona com soda, nas condições anteriormente descritas.

3) — Preconiza-se a espectrofotometria no U. V. para o doseamento da quinetazona, quer isolada, quer nos comprimidos, utilizando soluções a $1\text{ mg } \%$ em etanol absoluto ($\lambda=278\text{ m}\mu$; $E\text{ }1\% = 391$) e em $\text{OHNa } 0,1\text{N}$ ($\lambda = 269\text{ m}\mu$; $E\text{ }1\% = 273$).

Em ambos os métodos obtivemos resultados concordantes.

SUMMARY

The AA. present the spectrophotometrical characteristics of quinetazone on U. V. and I. R.

On describe the conditions in which this diuretic becomes into a iodide compound insoluble by adding a $\text{N}/10$ iodine solution.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) COHEN, E. E COLAB.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2731 (1960).
 (²) PAULIS, D. E DIPIETROMARIA, G.: *Boll. Chim. Farm.*, **99**, 15 (1960).
 (³) *Medicamentos de Actualidad*, **3**, 10 (1963).

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES DO ÓPIO POR CROMATOGRAPHIA EM CAMADA FINA

M. MANUELA LOPES M. LEAL
Licenciada em Farmácia

RUI HUGO DO ROSÁRIO
Director do Laboratório
da P. J. de Macau

ALBERTO J. C. RALHA
Director do Laboratório
da Polícia Científica

Constitui o ópio um dos produtos mais importantes no tráfico internacional ilícito e no uso de narcóticos. É, por conseguinte, muitas vezes necessária a sua identificação. No passado, a pesquisa fazia-se por extracção e separação dos alcalóides do ópio, então conhecidos, os quais, em seguida, eram identificados por reacções microquímicas de coloração ou de precipitação. Posteriormente, para esta segunda fase, adoptaram-se métodos físicos: espectrofotometria de UV, de IV e a difracção de raios X.

Mais recentemente, a cromatografia em papel veio facilitar extraordinariamente a identificação do ópio. Permite este método, com uma só operação, separar e identificar os vários alcalóides presentes (reacção de coloração e valores de Rf característicos).

São numerosos os trabalhos publicados, relacionados com a identificação do ópio por cromatografia de papel. No trabalho de BÜCHI e colaboradores (1) encontram-se referidos os mais importantes.

Depois do aparecimento da cromatografia em camada delgada (2), fizeram-se vários ensaios no sentido de aplicar esta nova técnica ao fim antes referido (3), (4), (5), (6), (7).

O presente trabalho é mais uma tentativa de aplicação da cromatografia em camada delgada à identificação rápida do ópio.

PARTE EXPERIMENTAL

Para procurar a fase móvel que mais conviesse à separação dos principais alcalóides do ópio, usaram-se placas, (10×20 cm) nas quais, em cada ponto, se depositaram soluções de dois desses alcalóides, sob a forma de base livre.

O adsorvente usado foi Gel de sílica segundo STAHL (Merck) e as misturas de alcalóides estudadas foram:

Morfina+papaverina.
Codeína+noscapina.
Morfina+codeína.
Papaverina+noscapina.
Tebaína+narceína,

colocadas nas placas por esta ordem, da esquerda para a direita.

Nas placas assim preparadas, experimentaram-se diversas fases móveis, com concentrações crescentes de um componente com maior poder de eluição.

A (fig. 1) apresenta os resultados obtidos. Estes resultados mostram ser possível, com estes sistemas, a separação de quase todos os alcalóides, exceptuando a noscapina da papaverina.

A concentração em etanol a (9:1) — Placa n.º 4 — mostrou ser a mais favorável.

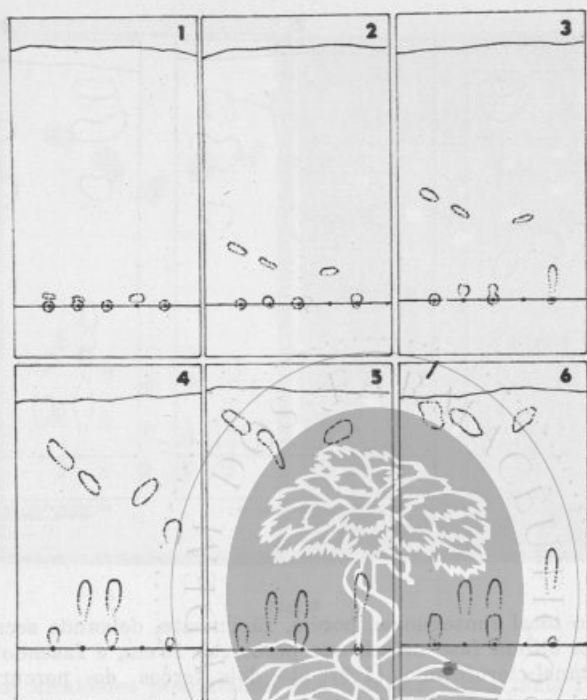


Fig. 1

QUADRO I

Composição dos eluentes usados nas placas da fig. 1

PLACA	FASE MÓVEL
1	Clorofórmio
2	Clorofórmio-etanol 9,8:0,2
3	» » 9,5:0,5
4	» » 9,0:1,0
5	» » 8,5:1,5
6	» » 8,0:2,0

Dos ensaios efectuados constatou-se que, embora aumentando a concentração em etanol, não era possível separar a noscapina da papaverina. Isto, em virtude dos valores de Rf se aproximarem da unidade. Experimentaram-se, assim, novos sistemas constituídos por misturas de desenvolventes com capacidades de eluição intermédias às dos anteriores.

A mistura de acetato de etilo — isopropanol (8:2) mostrou-se especialmente eficaz para separar os dois alcalóides: — noscapina e papaverina. No entanto, como pode observar-se [fig. 2 (2)], não serve para separar os restantes.

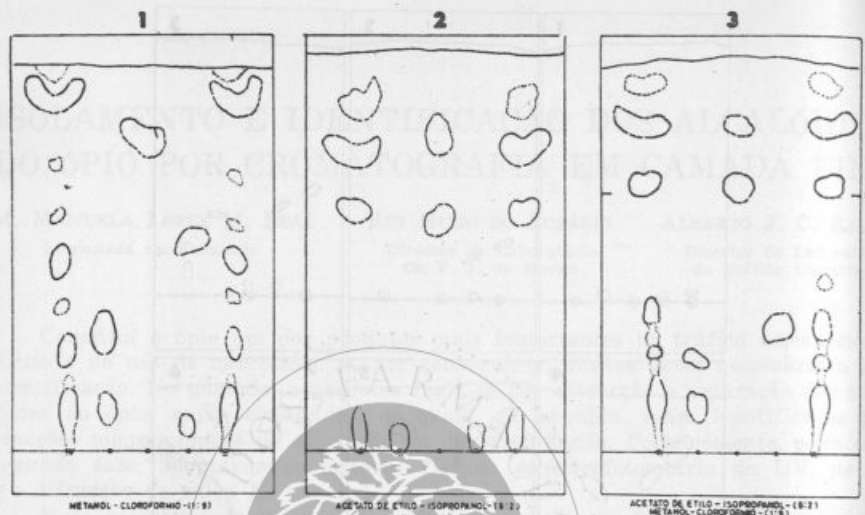


Fig. 2

A separação total consegue-se, porém, facilmente, deixando secar a placa em que se usou esta última fase móvel, que percorreu 15 cm, e fazendo depois correr o sistema metanol-clorofórmio (1:9) até dois terços do percurso inicial — [fig. 2 (3)].

Substituiu-se neste caso o etanol por metanol, que tem capacidade de eluição ligeiramente superior, pelo facto do percurso ter de ser menor.

A [fig. 2 (1)] mostra ainda a separação conseguida só com metanol-clorofórmio (1:9). Nas 3 placas da fig. 2 os pontos extremos correspondem a um extracto de ópio e os três restantes, respectivamente, da esquerda para a direita, a:

Morfina+codeína.
Noscapina+papaverina,
Narceína+tebaina.

O extracto do ópio foi obtido pelo processo descrito por NOURI e BROCKMANN-HANSEN (1) que consiste no seguinte:

200 mg de ópio foram tratados com 0,5 ml de metanol e 0,5 ml de amónia concentrada. Em seguida, triturou-se muito bem num almofariz com 3 g de óxido de alumínio, activado segundo Brockmann. Transferiu-se depois a mistura para uma coluna de 1 cm de diâmetro. Fez-se depois correr lentamente a 1 gota/min. 80 ml de uma mistura de clorofórmio álcool isopropílico (3:1) v/v. Concentrou-se depois o eluado quase à secura e foi este concentrado que se utilizou, em partes aliquotas, para depositar na placa.

O revelador utilizado foi o de Dragendorff modificado (2).

Para confirmar a identificação do ópio, pode ainda eluir-se a placa nas zonas onde se encontram os alcalóides principais separados. Para este fim, torna-se necessário revelar uma única faixa e a partir da posição dos alcalóides observada nela, marcando nas faixas restantes o material a eluir, já que as zonas fluorescentes que aparecem no UV (256 m μ) não correspondem à posição dos alcalóides.

Na (fig. 3) pode ver-se uma mesma placa fotografada, à esquerda, com luz ultravioleta e, à direita, com luz natural, depois de revelada.

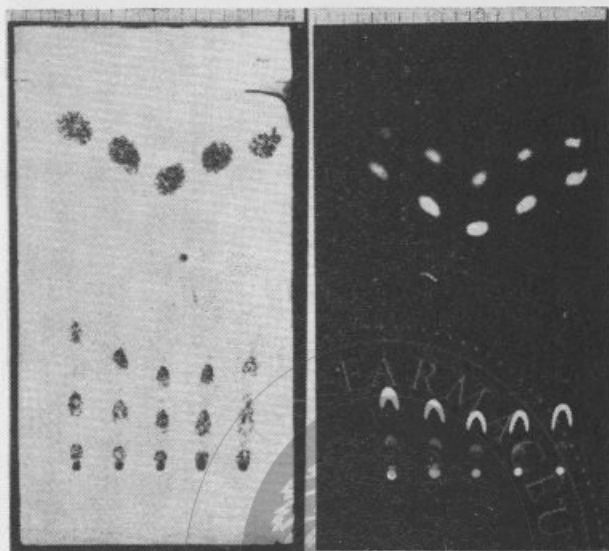


Fig. 3

De entre os alcalóides pesquisados, é a morfina o que mais facilmente pode ser eluído em condições de permitir a identificação por espectrofotometria no IV. A (fig. 4) apresenta o espectro de uma morfina isolada de uma destas placas, tendo, ao lado, para comparação, o espectro de morfina base, pura.

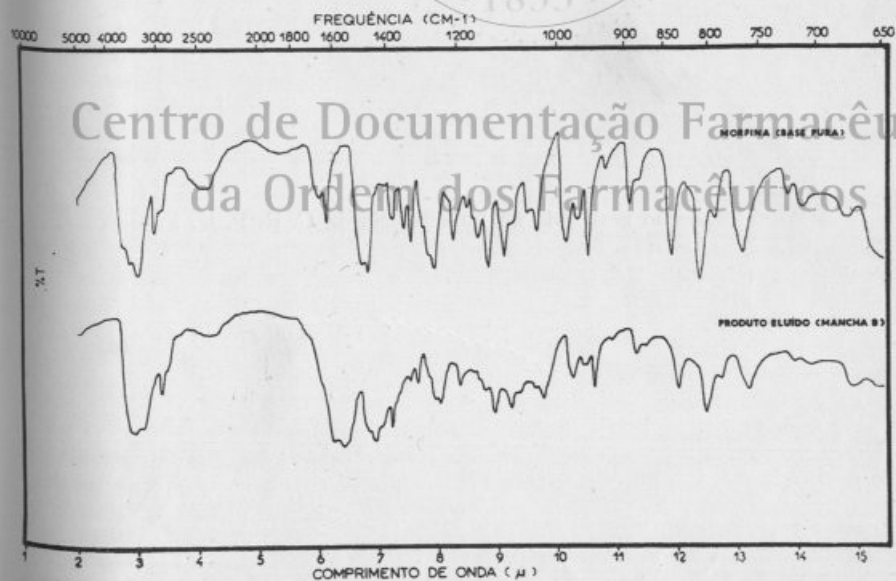


Fig. 4

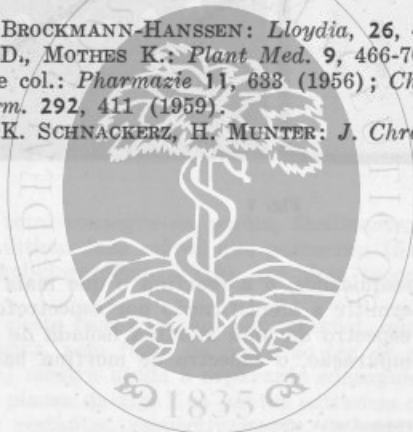
SUMMARY

There were used successively, two solvents systems for the same plate in such way that become separated the alkaloids: narceine, morphine, codeine, tebaine, papaverine and narcotine.

By eluting the zone who contained the morphine, it was isolated this alkaloid, pure enough to allow his identification by infrared spectrography.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BÜCHI, J. e SCHUMACHER, H.: *Pharm. Acta Helv.* **32**, 273 (1957).
- (²) «Chromatography» — Ed. MERCK — Darmstadt — 2.^a Ed. pág. 140.
- (³) DÖPKE, W.: *Arch. Pharm.* **295**, 605-606 (1962).
- (⁴) MARIANI A., MARIANI-MARINELLI, O.: *Rend. Ist. Super. Sanità* — **22**, 759-63 (1959).
- (⁵) MARY, N., BROCKMANN-HANSEN: *Lloydia*, **26**, 4-223 (1963).
- (⁶) NEUBAUER D., MOTHES K.: *Plant Med.* **9**, 466-70 (1961).
- (⁷) STAHL, E. e col.: *Pharmazie* **11**, 633 (1956); *Chemiker Ztg.* **82**, 323 (1958); *Arch. Pharm.* **292**, 411 (1959).
- (⁸) WALDI D., K. SCHNACKERZ, H. MUNTER: *J. Chromatog.* **6**, 61-73 (1961).



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

(Trabalho realizado no Laboratório da C. R. P. Q. F.)

IDENTIFICAÇÃO DO «EMBUDE»

(Oenanthe crocata L.) POR CROMATOGRAPHIA DE PLACA E ESPECTROFOTOMETRIA

M. MANUELA LOPES M. LEAL

Licenciada em Farmácia

C. SILVA SANTOS

Adjunto do Director do Laboratório de Polícia Científica

ALBERTO J. C. RALHA

Director do Laboratório de Polícia Científica

A *Oenanthe crocata* L. é uma planta da família das Umbelíferas que cresce espontânea em toda a Europa. No nosso País, encontra-se espalhada de Norte a Sul, sendo mais frequente nas margens dos rios, nas valas, e nos lugares húmidos (*). É uma das plantas mais venenosas que se conhecem e tem como nomes vulgares: «embude» ou «rabaças».

O seu poder tóxico é conhecido desde há muito tempo, estando descritos na literatura numerosos casos de envenenamentos acidentais de pessoas e animais (1, 2, 3). Por isto e também por ser utilizada na pesca criminosa é uma droga cuja identificação se torna frequentemente necessária.

Desde há muito que se procurou isolar o princípio ou princípios responsáveis pela acção tóxica da planta, acção que é especialmente acentuada nas raízes.

Já em 1830 — CORNERAIS e PIHAN-DUFEILLAY (4) se referem a um produto resinoso contido na raíz, especialmente venenoso, mas foi POHL (5) quem primeiro isolou uma substância relativamente pura, embora ainda amorfa e de natureza resinosa, a que chamou oenantatoxina.

Só depois, em 1949, é que CLARKE, KIDDER e ROBERTSON (6) purificaram o produto anterior, por cromatografia de coluna, tendo-o obtido pela primeira vez no estado cristalino.

A estrutura química da cenatatoxina foi esclarecida graças aos trabalhos de ANET, LYTHGOE, SILK e TRIPPETT (7, 8). Os ensaios de degradação e os dados espectrais mostraram tratar-se do heptadeca-2,8,10-trieno-4,6-dieno-1,14-diol, no qual todas as duplas ligações apresentam configuração *trans* (Fig. 1).

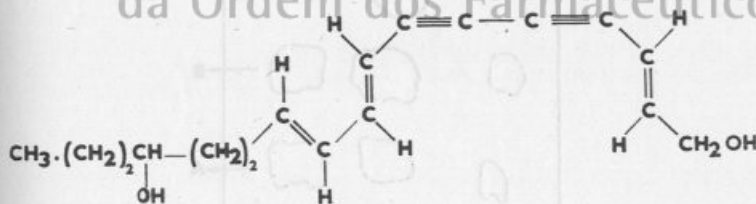


Fig. 1

Ao lado deste composto, os mesmos autores isolaram (cromatografia de coluna) duas substâncias próximas: oenantetol e oenantetona, que diferem da anterior por serem, respectivamente, um mono álcool (14-desoxi-oenantatoxina) e uma mono cetona (14-cetona da 1-desoxi-oenantatoxina).

Além dos pontos de fusão e de outras características físicas, os autores referem os espectros de UV destes compostos que apresentam numerosos máximos e mínimos na região compreendida entre 210 e 350 m μ .

PARTE EXPERIMENTAL

Para a identificação rápida da droga, utilizou-se o seguinte método:

Cerca de 10 g das raízes, depois de finamente cortadas e trituradas, foram extraídas com éter etílico (4×20 ml). As fases etéreas, reunidas, foram agitadas com solução 2 N de hidróxido de sódio, e, finalmente, lavadas com água destilada. Depois de desidratação com sulfato de sódio anidro, filtração e evaporação até à secura, sob pressão reduzida e a baixa temperatura, obteve-se um resíduo da ordem de poucas dezenas de mg. Este resíduo foi dissolvido em metanol.

A solução metanólica referida que deve conservar-se a temperatura baixa, ao abrigo da luz e do ar, de preferência em atmosfera de azoto, tinha uma concentração de cerca de 1 mg/ml e foi diluída a 1:4 com metanol. A diluição resultante foi aplicada em partes alíquotas numa placa de alumina preparada segundo STAHL (*).

Empregou-se colorofórmio como fase móvel. O desenvolvimento foi efectuado ao abrigo da luz e em atmosfera de azoto. Para um deslocamento frontal de 16 cm, foram necessários cerca de 40 minutos.

Dado o carácter fortemente insaturado dos compostos a isolar usou-se, como revelador, uma solução de permanganato de potássio, em meio alcalino (Reagente de Bayer) que dá manchas amarelas sobre fundo lilaz.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

ADSORVENTE - ÓXIDO DE ALUMÍNIO
ELUENTE - CLOROFÓRMIO
REVELADOR - SOL. ALCALINO $MnO_4^- K$

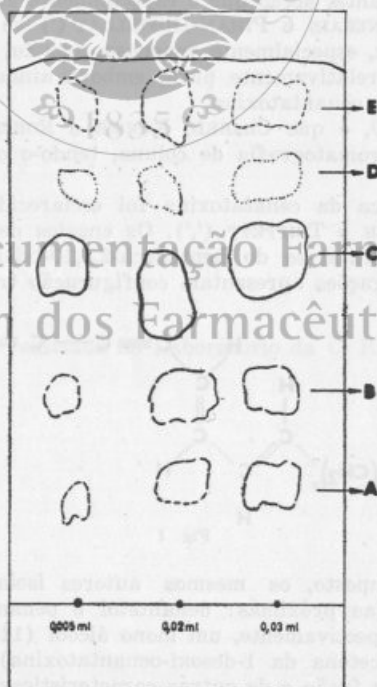


Fig. 2

Para completar a identificação, utilizou-se uma nova placa com 5 pontos em que se revelou, após desenvolvimento, a zona correspondente a um dos pontos externos.

Assim, foi possível marcar zonas correspondentes aos diferentes componentes nos restantes quatro pontos não revelados. Seguidamente, destacaram-se essas diferentes faixas que foram, então, eluídas com etanol. A separação deste dissolvente foi feita por centrifugação, sendo utilizadas as soluções assim obtidas, imediatamente, na obtenção de espectros UV.

Valores de máximos descritos

Oenantatoxina	213	252	267	281 *	296	315,5	337,5
Oenantetol	213	252	267	281 *	297	316	338
Oenantetona	—	251	267	280 *	296	315	337

Valores de máximos encontrados

Mancha A	215 (225,235)	253	268	281 *	295	315	337
Mancha B	— (227,236)	255 *	268	281 *	296	313	337
Mancha C	— (237)	252	267	281 *	296	313	337
Mancha E	213 (235)	250	265	280 *	297	315	337

Fig. 3

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

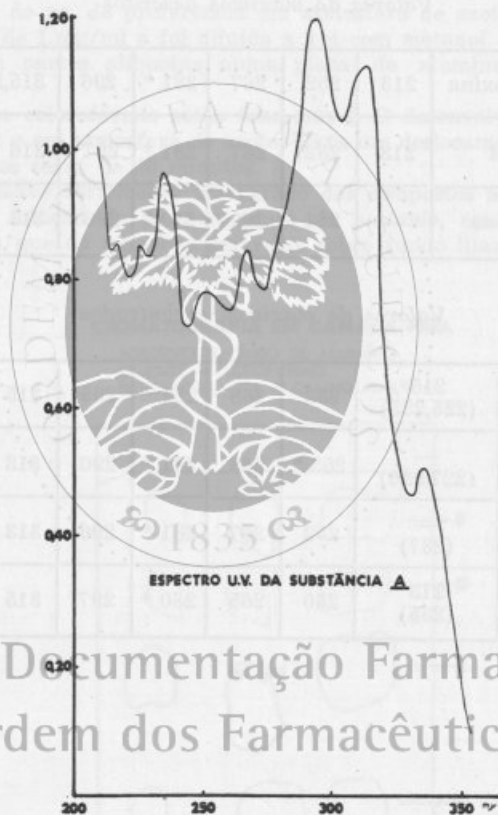
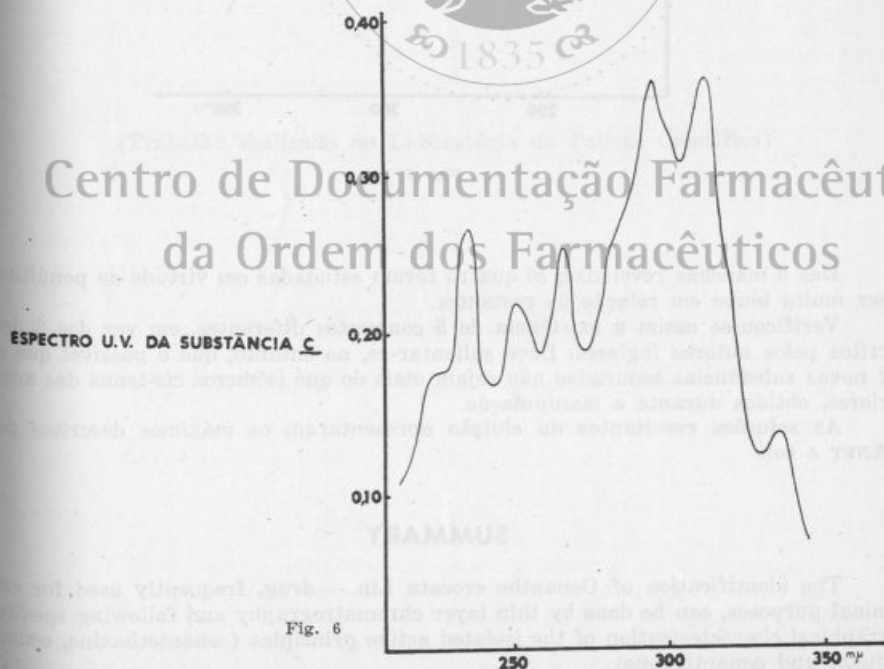
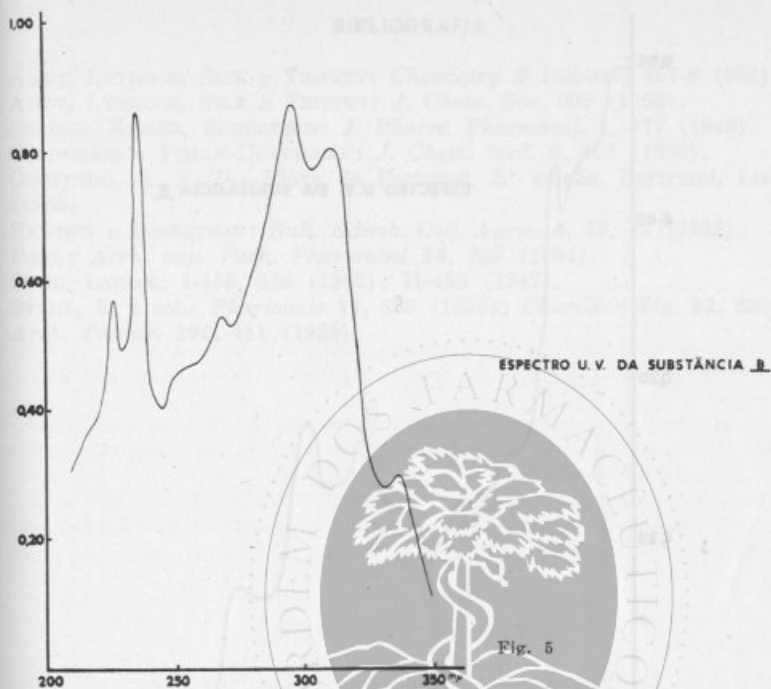
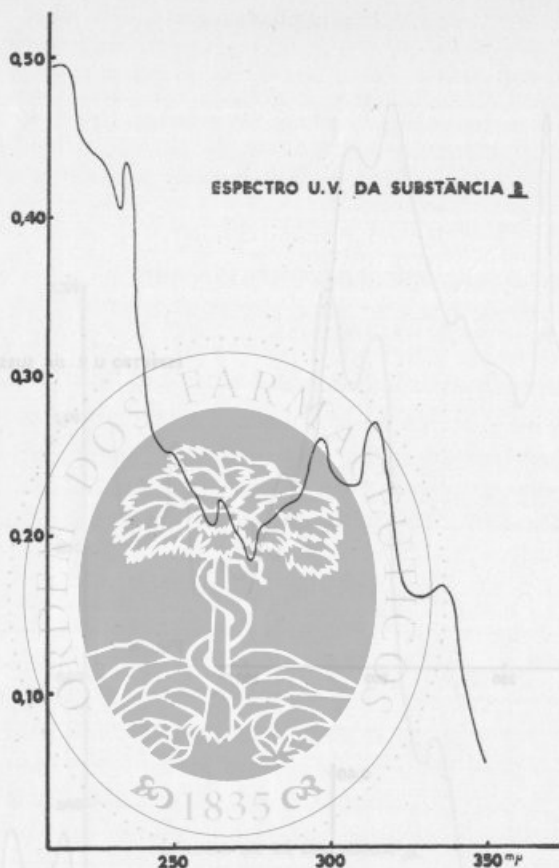


Fig. 4

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

Das 5 manchas reveladas, só quatro foram estudadas em virtude da penúltima ser muito ténue em relação às restantes.

Verificou-se assim a existência de 5 compostos diferentes, em vez dos 3 descritos pelos autores ingleses. Deve salientar-se, no entanto, que é possível que as 2 novas substâncias separadas não sejam mais do que isómeros *cis-trans* dos anteriores, obtidos durante a manipulação.

As soluções resultantes da eluição apresentaram os máximos descritos por ANET e col.

SUMMARY

The identification of *Oenanthe crocata* Lin. — drug, frequently used for criminal purposes, can be done by thin layer chromatography and following spectrographical characterization of the isolated active principles (oenantethoxine, oenanthetol and oenanthetone).

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ANET, LYTHGOE, SILK e TRIPPET: *Chemistry & Industry* 757-8 (1952).
 (²) ANET, LYTHGOE, SILK e TRIPPET: *J. Chem. Soc.* 309 (1953).
 (³) CLARKE, KIDDER, ROBERTSON: *J. Pharm. Pharmacol.* 1, 377 (1949).
 (⁴) CORNERAIS e PIHAN-DUFFELLAY: *J. Chem. med.* 6, 459 (1830).
 (⁵) COUTINHO, A. X. P.: *Flora de Portugal*, 2.^a edição, Bertrand, Lisboa, 537 (1939).
 (⁶) FENTON e ROBERTSON: *Bull. Edimb. Coll. Agric.* 4, 13, 42 (1931).
 (⁷) POHL: *Arch. exp. Path. Pharmacol* 34, 259 (1894).
 (⁸) POHL, *Lancet*: I-155, 316 (1952); II-485 (1947).
 (⁹) STAHL, E. e col.: *Pharmazie* 11, 633 (1956); *Chemiker Ztg.* 82, 323 (1958); *Arch. Pharm.* 292, 411 (1959).



(Trabalho realizado no Laboratório de Polícia Científica)

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

NOTA SOBRE A PREPARAÇÃO E ENSAIO DO IODETO DE NICOTINAMIDA

A. MARQUES LEAL

M. M. LEITE INÁCIO

M. MANUELA LOPES LEAL

Licenciados em Farmácia

O iodeto de nicotinamida foi utilizado nos E. U. A., há alguns anos, associado ao iodeto de potássio, em casos de arteroesclerose generalizada e hemorragias da retina (1,2,3).

A pedido dum oftalmologista de Lisboa foi-nos posto o problema da preparação dum medicamento análogo, pelo facto do produto especializado estrangeiro não estar à venda em Portugal.

Não tendo encontrado quaisquer referências bibliográficas sobre a preparação e propriedades físico-químicas do iodeto de nicotinamida, tivemos de efectuar alguns ensaios nesse sentido, os quais constituem o assunto desta nota.

PARTE EXPERIMENTAL

O iodeto de nicotinamida foi preparado do seguinte modo: dissolveu-se a quente 24,4 g de nicotinamida em cerca de 60 ml de álcool e adicionou-se 45 g duma solução de ácido iodídrico a 57% (Merck p.a) previamente descolorado com umas gotas de solução de hipossulfito de sódio diluída; por arrefecimento separou-se um produto cristalino amarelado que depois de filtração por Büchner foi lavado com álcool e finalmente com clorofórmio.

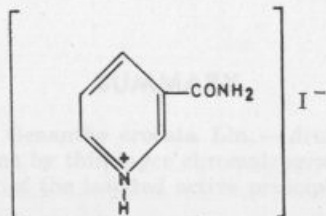
Rendimento: cerca de 40 g, após secagem ao ar, ao abrigo da luz.

O produto apresenta ponto de fusão cerca de 223-226°, com decomposição (aquecimento rápido desde $\pm 215^\circ$) que se não modifica sensivelmente por recristalização do álcool fervente (cerca de 10 p.). O ponto de fusão instantâneo é praticamente idêntico.

O iodeto de nicotinamida é muito solúvel na água, com reacção fortemente ácida (pH cerca de 2,0 na solução a 10%), praticamente insolúvel no álcool frio, na acetona, no clorofórmio e no éter.

A solução aquosa a 5% dá as reacções clássicas dos iodetos (pp. com o Cl₂, Hg, libertação de iodo com Cl₂, Fe, etc.) e dá também pp. com o ácido pícrico (amarelo), com o Reagente de Nessler (branco-amarelado) e com o ácido silico-túngstico (branco).

Partindo da hipótese de que o composto teria a seguinte fórmula:



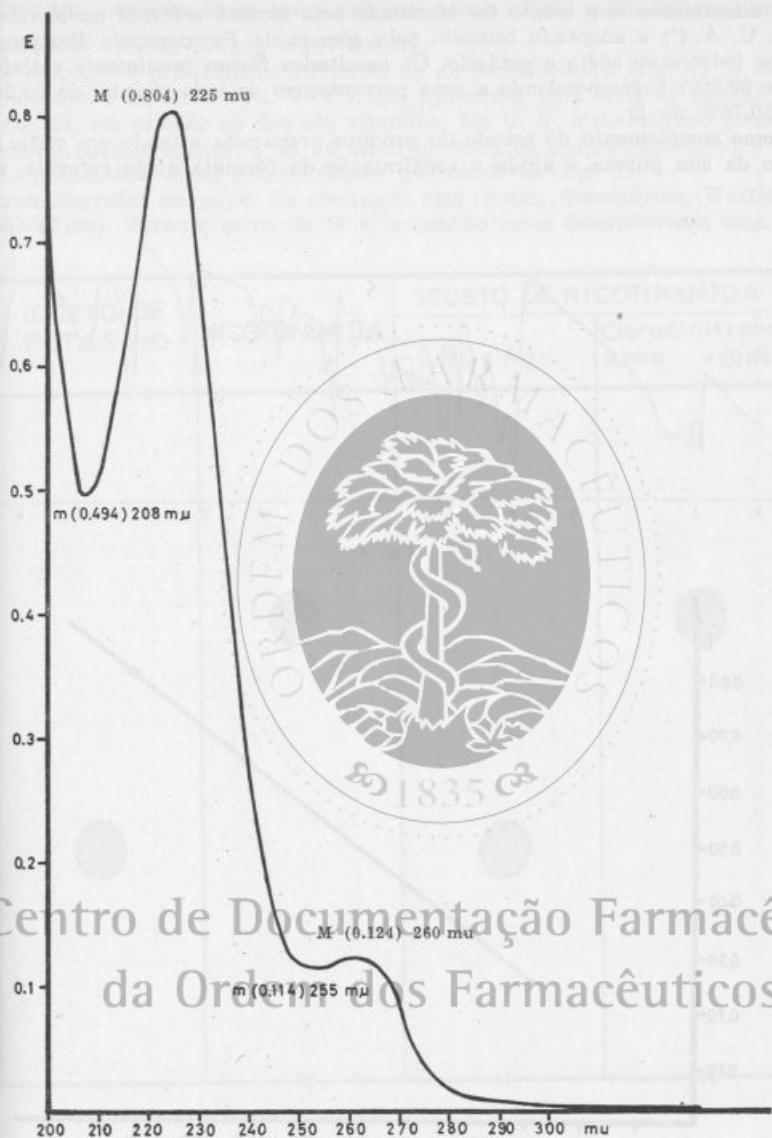


Fig. 1

foram tentadas duas técnicas de doseamento volumétrico: uma acidimetria directa e a iodometria com iodato, em meio fortemente clorídrico (*).

Para a titulação com soda decinormal dissolveu-se 0,25 g do produto em 25 ml de água e utilizou-se como indicador o vermelho de metilo; os resultados obtidos oscilaram entre 97,5 e 99% (1 ml da solução 0,1N=0,025003 g de iodeto de nicotinamida).

O doseamento com iodato foi efectuado pela técnica referida na Farmacopeia dos E. U. A. (*) e adoptada também pela adenda da Farmacopeia Portuguesa (†) para os iodetos de sódio e potássio. Os resultados foram igualmente satisfatórios (98,7 e 99,8%) correspondendo a uma percentagem de iodo vizinha de 50,26 (teórico: 50,76% de I).

Como complemento do estudo do produto preparado e tendo em vista a verificação da sua pureza e ainda a confirmação da fórmula atrás referida, estuda-

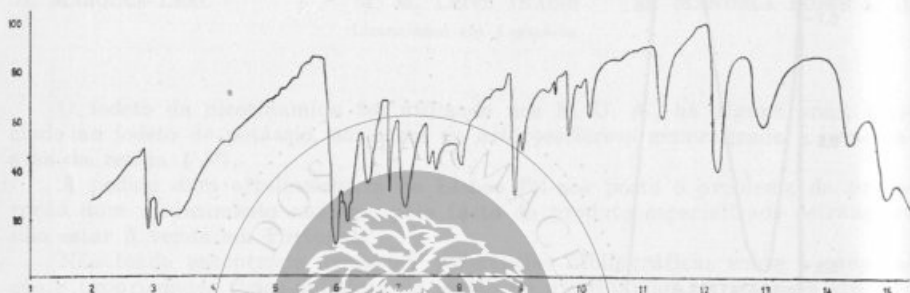


Fig. 2

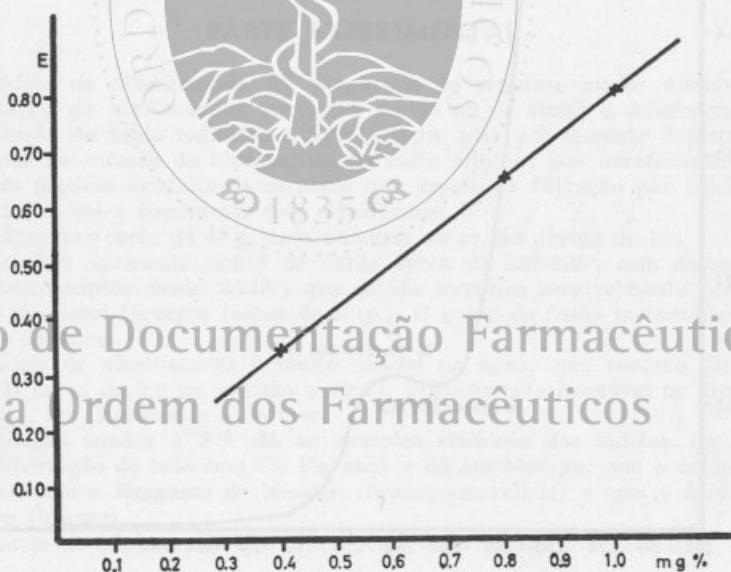


Fig. 3

ram-se também os seus espectros no U. V. e I. V. e efectuaram-se cromatografias em papel e em placa.

O espectro no U. V. foi efectuado sobre a solução aquosa a 1 mg %, desde 200 a 280 $m\mu$ (*). O máximo principal localizou-se a cerca de 224 $m\mu$

(*) Determinado em Unicam SP-500 e também num espectrofotómetro Zeiss.

(E 1% 800±10), observando-se outro máximo pouco nítido a 260-262 m μ ; os mínimos situam-se em 251-253 m μ e 207-208 m μ .

Este espectro é nitidamente diferente do da nicotinamida (fig. 1), o mesmo acontecendo com o espectro no I. V. (*), que apresenta uma série de bandas diferentes (fig. 2), em relação ao daquela vitamina. No U. V. e no máximo principal, as densidades ópticas seguem a lei de Beer, na zona de concentrações entre 0,4 e 1,0 mg %, permitindo assim determinações quantitativas (fig. 3).

A cromatografia em papel foi efectuada com técnica descendente, Watterman n.º 1 (50×40 cm), durante cerca de 14 h. e usando como desenvolvvente uma mis-



Fig. 4

tura de n-butanol-metanol-amónia a 8,5% (3:1:1), já utilizada no estudo do nitrato de nicotinamida (*). Como reveladores, usaram-se nitrato de prata (sol. aquosa a 5 %) para o ião I', e para a nicotinamida, a solução metanólica de clorodinitrobenzeno e soda normal (*).

Fizeram-se paralelamente cromatogramas da solução do produto em estudo (a 1%) e de soluções equivalentes de nicotinamida (0,5%) e de iodeto de potássio (0,6%), usando-se igualmente o mesmo volume (6 μ l).

(*) Este espectro foi efectuada no Laboratório da Polícia Científica (Director Prof. Correia Balha) usando «pastilha» de BrK (dil. 1:300) e o aparelho Perkin-Elmer, mod. 21.

O iodeto de nicotinamida deu duas manchas de Rf 0,52 e 0,76, coincidentes com as obtidas, respectivamente, com o iodeto de potássio e a nicotinamida (fig. 4).

Uma cromatografia em placa (10×17,5 cm) com sílica-gel, usando o mesmo desenvolvedor, gotas de 10 µl, efectuada com soluções análogas e durante cerca de 3 horas, não deu separação do ião I' (fig. 5).



Fig. 5

As reacções de identificação e os métodos de doseamento estudados permitem a identificação e dosagem do iodeto de nicotinamida em cápsulas e comprimidos, quando associado ao iodeto de potássio.

CONCLUSÕES

1. O iodeto de nicotinamida prepara-se facilmente, em meio alcoólico, pela acção do ácido iodídrico sobre a nicotinamida.
2. O produto é microcristalino, de ponto de fusão definido, fortemente ácido e com espectros no U. V. e I. V. característicos.
3. Como técnicas de doseamento foram ensaiadas satisfatoriamente a espectrofotometria no U. V., a acidimetria em meio aquoso e a técnica volumétrica com iodato (usada normalmente para os iodetos alcalinos).

SUMMARY

The product was obtained by the action of the hydroiodic acid (57 % solution) upon an alcoholic solution of nicotinamide. It is a pale yellow crystalline powder of m.p.=223 — 226°, water-soluble, insoluble in the organic solvents, strongly acid, which is characterized by the iodide's reactions and precipitates by the Nessler reagent picric acid and silicotungstic acid.

It can be assayed by acidimetry in aqueous solution in the presence of methyl red; an by the iodate method, in a strongly chloridric solution as pointed on the Addendum of the Portuguese Pharmacopea for potassium iodide.

In 1 mg % aqueous solution presents a characteriscal spectrum in the U. V. with two maximums (at 224 m μ and 261 m μ) and two minimums (at 208 m μ and 251 m μ).

The I. R. spectrum is, also, clearly different from that of the nicotinamide.

The purity and structure of the compound were confirmed by paper chromatography.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FEINBLATT, T. M. e colab.: *Am. J. Digest. Dis.* 22, 5 (1955).
 (²) GUAGLIANO, G. e STOPHANI, L.: *Minerva Med.* 48, 3544 (1957).
 (³) ABRAHAMSON, I. A. Jr. e ABRAHAMSON, I. A. *Am. J. Ophth.* 42, 771 (1956).
 (⁴) Pharmacopeia Portuguesa (Supl. IV Ed.).
 (⁵) LEITE INÁCIO, M. M., ANDRADE, M. A. e MARQUES LEAL A.: *Rev. Port. Farm.* 14, 17 (1964).

(Trabalho realizado na Secção de Verificação e Estudo do Lab. da Comp. Centro de Documentação Farmacêutica Port. Higiene).

da Ordem dos Farmacêuticos

O PROCESSO DO MATRAZ DE OXIGÉNIO DE SCHÖNIGER APLICADO À ANÁLISE FARMACÉUTICA

GERARDO MATTA

Licenciados em Farmácia

MARIA JÚLIA SILVA

A mineralização de compostos orgânicos com vista ao doseamento dos elementos que entram na sua constituição, foi sempre um problema do maior interesse para o analista.

Tais processos nem sempre de execução fácil exigiam por vezes uma aparelhagem especial e bastante dispendiosa. O ideal seria conseguir um método que fosse a um tempo rápido e preciso, não exigindo material caro.

A primeira tentativa neste sentido deve-se a HEMPEL, que em 1892 doseou o enxôfre por uma técnica bastante simples. A substância era colocada num cêsto de platina que se introduzia de seguida num matraz de 10 litros, cheio com oxigénio; a combustão conseguia-se pela corrente eléctrica. O enxôfre passava a sulfato pela acção oxidante da água de bromo e em seguida doseava-se gravimetricamente sob a forma de sulfato de bário.

Em 1904 GRAEFE modificou o processo de HEMPEL introduzindo uma tira de papel ou algodão que era incendiada antes de ser colocada no matraz, o que facilitava a combustão da substância.

Em 1910 esta técnica foi usada por MARCUSSON e DÖSCHER para o doseamento dos halogénios. Estes metalóides doseavam-se gravimetricamente sob a forma de halogenetos de prata.

Em 1922 aplicando este método VOTOCEK doseou o cloro com nitrato de mercúrio. O processo caiu em desuso e só 30 anos mais tarde SCHÖNIGER o retomou dando-lhe o desenvolvimento e expansão que merecia. Assim, em 1955 SCHÖNIGER introduzia com o maior êxito o método do matraz de oxigénio em microanálise. Os resultados obtidos mostraram-se comparáveis em exactidão aos dos métodos clássicos de mineralização com a vantagem de serem de execução rápida e fácil. Eis a seguir uma descrição detalhada do método tal como o praticamos nos nossos laboratórios no controle analítico de numerosas matérias primas farmacêuticas.

O material resume-se a um matraz cónico com a capacidade de 100 a 1.000 ml com boca esmerilhada a que se adapta perfeitamente uma rolha também esmerilhada, com um fio de platina soldado ao centro; aquele fio termina numa rêde de platina onde se coloca a amostra (fig. 1) (a)). Nos nossos ensaios trabalhámos sempre com um matraz de 500 ml. Quando a amostra a mineralizar é sólida coloca-se num pequeno pedaço de papel de filtro sem cinzas; se é líquida introduz-se em cápsula de gelatina apropriada. Leva-se a rêde prèviamente à ignição para assegurar uma perfeita secagem e destruição de toda a matéria orgânica. O matraz contendo um líquido absorvente apropriado enche-se com oxigénio, durante cerca de um minuto. O papel de filtro (fig. 1) (b) é inflamado e introduzido imediatamente dentro do matraz que se inverte de forma a levar o líquido de absorção a rodear o gargalo. São necessários apenas alguns segundos para conseguir a combustão completa da substância. Em consequência da absorção originada dentro do matraz um certo grau de vácuo que mantém a rolha fortemente ade-

rente ao gargalo. Agita-se durante 10 minutos e deixa-se depois em repouso em repouso meia hora, para assegurar um contacto perfeito dos gases libertados durante a combustão com o líquido absorvente, de forma a garantir a sua perfeita absorção. Depois tira-se a rolha que se lava cuidadosamente assim como o fio e a rêde de platina.

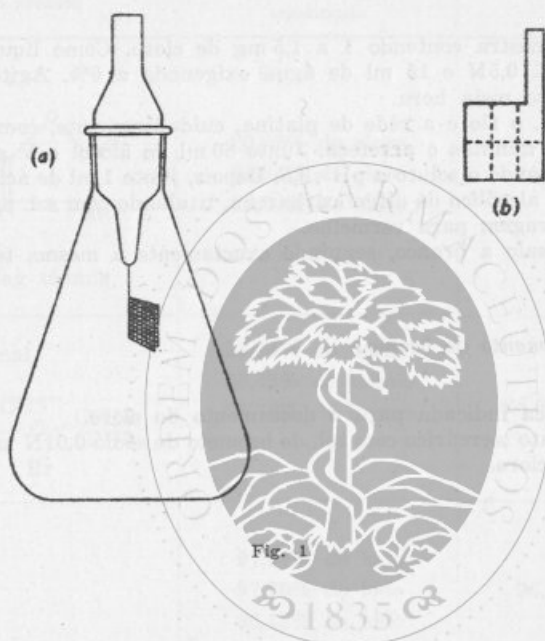


Fig. 1

PARTE EXPERIMENTAL

1) DOSEAMENTO DOS HALOGENÍOS

— Cloro e Bromo

Reagentes:

- 1) — Álcool.
- 2) — Sol. alcoólico de difenilcarbazona a 0,5%.
- 3) — Sol. alcoólico de azul de bromofenol a 0,05%.
- 4) — Água oxigenada a 6%.
- 5) — Solutos de hidróxido de potássio 0,5N e 0,05N.
- 6) — Ácido azótico 0,5N e 0,05N.
- 7) — Solutos padrão de nitrato mercúrico (3 g de nitrato mercúrico são dissolvidos em 500 ml de ácido nítrico 0,01N e completam-se 1.000 ml). Este soluto deve ficar com um pH=1,66. Afere-se com sol. do cloreto de sódio 0,01N da seguinte maneira:

Pipete 10 ml do soluto titulado de cloreto de sódio, junte 10 ml de água, 80 ml de álcool e V gotás de azul de bromofenol, ajustando o pH da solução a 3,5 com

sol. de hidróxido de potássio ou com ácido azótico. Junto 1 ml de ácido nítrico 0,05N, 0,5 ml de difenilcarbazona e titule com soluto padrão de nitrato mercúrico até viragem para vermelho.

Técnica de doseamento do Cloro:

Pese uma amostra contendo 1 a 1,5 mg de cloro. Como líquido de absorção use 1 ml de OHK 0,5N e 15 ml de água oxigenada a 6%. Agite durante 10 m. Deixe em contacto meia hora.

Lave a rolha, o fio e a rede de platina, cuidadosamente, com 10 ml de água. Ferva durante 5 minutos e arrefeça. Junte 80 ml de álcool e V gotas de azul de Bromofenol, acertando o soluto a $\text{pH}=3,5$. Depois, junte 1 ml de ácido nítrico 0,05N e 0,5 ml de soluto alcoólico de difenilcarbazona, titulando com sol. padrão de nitrato mercúrico até viragem para vermelho.

Faça um ensaio a branco, seguindo exactamente a mesma técnica.

Técnica de doseamento de bromo:

Siga a técnica indicada para o doseamento do cloro.

Titule o nitrato mercúrico com sol. de brometo de sódio 0,01N usando o processo indicado para o cloro.

b — Iodo

Reagentes:

- 1) — Ácido bromo-acético.
- 2) — Sol. de Hidróxido de sódio 2N.
- 3) — Água oxigenada a 30%.
- 4) — Ácido fórmico.
- 5) — Ácido sulfúrico 2N.
- 6) — Iodeto de potássio.
- 7) — Sol. de hipossulfito de sódio 0,02N.

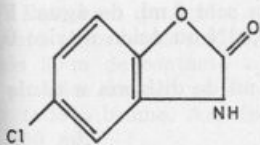

Técnica de doseamento do iodo:

Pese uma amostra contendo cerca de 5 mg de iodo. Use como líquido absorvente 10 ml de água, 1 ml de soda 2N e II a III gotas de água oxigenada a 30%. Agite 10 minutos e deixe em contacto durante 30 m. Ferva durante 5 m. para expulsar a água oxigenada. Junte 10 ml de ácido bromo-acético. Elimine o excesso de bromo juntando algumas gotas de ácido fórmico. Deixe em repouso 3 m. Junte 4 ml de ácido sulfúrico 2N e 0,3 g de iodeto de potássio. Titule com hipossulfito de sódio 0,02N.

$$\% \text{ de I} = \frac{n \times 0,4231 \times 100}{p}$$

No quadro publicado a seguir (Quadro n.º I) reúnem-se alguns resultados obtidos em ensaios de rotina, realizados nos nossos Laboratórios de Verificação Analítica:

QUADRO I

Nome do produto	Taxa de Halogénio encontrado	Taxa de Halogénio teórico
Clorzoaxona PARAFLEX *  * m. reg. Cilag chimie	20,62% de cloro 20,84% de cloro 21,00% de cloro	20,9% de cloro
Acetilcarbromal $\text{CO} \begin{matrix} \text{NH CO CH}_3 \\ \text{NH CO} \end{matrix} \text{— C —} \begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$ Br	28,74% de bromo 28,43% de bromo 28,78% de bromo	28,62% de bromo
Iodofórmio CH_2I_2	97,07% de iodo 97,70% de iodo 96,48% de iodo	96,69% de iodo
Diodoquin 	64,1% de iodo 63,31% de iodo 65% de iodo	63,94% de iodo

2) DOSEAMENTO DO ENXOFRE

Reagentes

- 1 — Água oxigenada a 30%.
- 2 — Sol. de hidróxido de sódio N/10.
- 3 — Ácido azótico.
- 4 — Sol. Alcoólico de azul de bromofenol a 0,1%.
- 5 — Ácido azótico 0,02N.
- 6 — Sol. de hidróxido de potássio 0,02N.

- 7 — Ácido acético a 20% (V/V).
 8 — Acetona.
 9 — Sol. de nitrato de chumbo 0,02N (Este soluto é titulado com ácido sulfúrico 0,01N).
 10 — Sol. acetónico de ditizona a 0,5% (recente).

Técnica de doseamento:

A amostra deve conter cerca de 1 mg de S. Como líquido absorvente usam-se 4 ml de soda N/10, 6 ml de água e VI gotas de água oxigenada. Agite 10 m e deixe em contacto 30 m. Lave a rolha e as paredes do matra com 2 ml. de água. Ferva 1 m. Arrefeça e leve o soluto a pH=3,5 usando soda 0,02N ou ácido nítrico 0,02N em presença do azul de bromofenol.

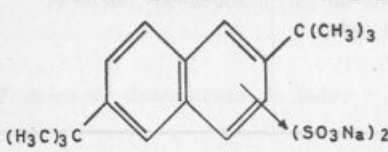
Junte 1 ml de ácido acético, 15 ml de acetona, 0,8 ml de ditizona e titule com nitrato de chumbo até viragem para vermelho.

1 ml de $(NO_3)_2 Pb <> 320,66 \gamma$ de S.

Faça um ensaio a branco seguindo rigorosamente a mesma técnica descrita.

No Quadro n.º II inscrevem-se os dados experimentais obtidos nalguns doseamentos de enxofre em vários compostos orgânicos.

QUADRO II

Nome do produto	Taxa de enxofre doseado	Taxa de enxofre teórico
Metionina $\begin{array}{c} CH_3SCH_2 \\ \\ CH_2 \\ \\ CHNH_2 \\ \\ COOH \end{array}$	21,88% de enxofre 21,88% de enxofre 21,55% de enxofre	21,49% de enxofre
Ditercbutilnaftaleno- disulfonato de sódio 	13,98% de enxofre 14,09% de enxofre 14,24% de enxofre	14,4% de enxofre

3) DOSEAMENTO DO FÓSFORO

Reagentes:

- 1 — Sol. de hidróxido de sódio 0,8N.
 2 — Água de bromo saturada.
 3 — Ácido sulfúrico dil. (110 ml de ácido sulfúrico concentrado são diluídos com 180 ml de água).

- 4 — Sol. de molibdato de sódio a 45%.
- 5 — Acetato de amilo (agitado com metade do seu volume de ácido sulfúrico 2N).
- 6 — Ácido sulfúrico concentrado (prèviamente aquecido até à ebulição).
- 7 — Fosfato monopotássico p.a. (seco a 50° no vácuo). Preparar um soluto padrão contendo 2 mg de fósforo por ml.

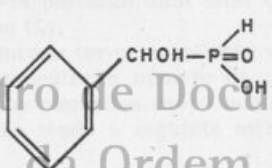
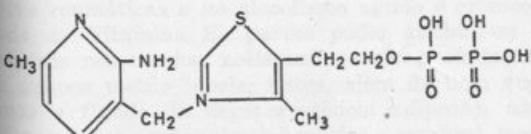
Técnica de doseamento:

Pese uma quantidade de amostra equivalente a cerca de 2 mg de fósforo. Como líquido absorvente empregue 4 ml de hidróxido de sódio e 5 ml de água de bromo. Após 30 m de contacto tire a rolha e adicione 3 ml de ácido sulfúrico dil. Lave as paredes do matraz com 5 ml de água. Ferva durante 2 a 3 minutos até eliminar todo o bromo. Arrefeça e passe o conteúdo do matraz para um balão aferido de 200 ml.

Tome 5 ml desta diluição, junte 5 ml de água, 1,8 ml de ácido sulfúrico e 5 ml de soluto de molibdato de sódio. Agite. Adicione 10 ml de acetato de amilo e agite de novo durante 5 m. Centrifugue. Separe a camada de acetato de amilo e leia no espectrofotómetro a 400 m μ . Paralelamente, realize um ensaio com um padrão de fosfato contendo 30 a 100 γ de fósforo. Faça um ensaio a branco com os reagentes. Das leituras das densidades óticas deduza a percentagem de fósforo existente na amostra em ensaio.

Podem ver-se no Quadro n.º III alguns resultados experimentais obtidos com esta técnica no doseamento do fósforo em vários compostos orgânicos.

QUADRO III

Nome do produto	Taxa de fósforo doseado	Taxa de fósforo teórico
<p>Ácido α-oxibenzilfosfínico</p> 	<p>17,66% de fósforo 17,76% de fósforo 17,76% de fósforo</p>	<p>18% de fósforo</p>
<p>Cocarboxilase</p> 	<p>12,50% de fósforo 12,37% de fósforo 12,42% de fósforo</p>	<p>12,94% de fósforo</p>

RESUMO E CONCLUSÕES

Depois duma breve introdução ao estudo do método do matraz de oxigénio de Schöniger, apresentam-se algumas técnicas usadas correntemente nestes Laboratórios, no doseamento de halogénios (cloro, bromo, iodo), enxofre e fósforo,

em diversos medicamentos orgânicos. Destruída a matéria orgânica e transformados os metalóides nos respectivos anidridos, estes são recolhidos numa solução absorvente e os sais resultantes doseados por métodos microvolumétricos ou microcolorimétricos que se descrevem. Registam-se alguns resultados experimentais obtidos por este processo, no contróle analítico da cloroxazona (Paraflex) acetilcarbromal, iodofórmio, 5-7-di-iodo-8-hidroxiquinoleína (Di-iodoquin), 2, 6-ditercbutil-naftaleno-disulfonato de sódio, ácido- α -oxibenzilfosfínico (Benzofosfan) e cocarboxilase.

SUMMARY

The advantages of the oxygen flask method are described. The methods for determination of halogens, sulphur and phosphorus are discussed and their advantages stressed.

Some drugs as Chlorzoxazone, acetylcarbromal, iodoform, diodoquin, methionine, sodium 2,6-ditertiarybutyl-naphalene disulfonate, α -oxibenzilphosphinic acid and cocarboxylase were assayed by Schöniger method with good results.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MACDONALD, A. M. G.: *The Analyst*, **86**, 3-11 (1961).
- (²) REVERCHON, M.: *Chim. Anal.*, **44**, 340-4 (1962).
- (³) CHENG, F. W.: *Microchem. J.*, **3**, 537-542 (1959).
- (⁴) SOLP, H. e DEMOEN, P.: *Microchem. J.*, **4**, 77-87 (1960).
- (⁵) KIRSTEN W. J. e CARLSSON M. E.: *Microchem. J.*, **4**, 3-31 (1960).

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

(Trabalho elaborado no Serviço de Estudos e Ensaaios Analíticos dos Laboratórios Azevedos).



NOTAS POLAROGRAFICAS. I — DOSEAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA VITAMINA B₁₅ (APG)

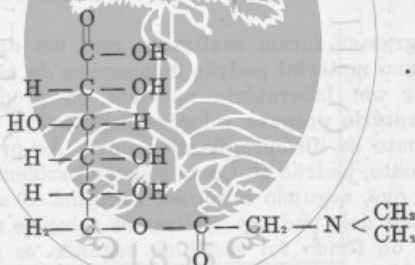
J. F. DO VALE SERRANO
Prof. Cat. Fac. Farmácia

A. M. ROQUE DA SILVA
Assistente Fac. Farmácia
Bolseiro do I. A. C.

Em 1951, E. T. KREBS e colab. (*) isolaram do alperche e do arroz uma substância que denominaram Vitamina B₁₅ ou ácido pangâmico (APG).

Anos mais tarde, esse mesmo investigador (**) publica um trabalho em que indica processos de síntese do APG.

Para este autor a Vitamina B₁₅ teria a fórmula bruta C₁₀H₁₉O₄N (P.M. = 281). A fórmula de estrutura do mesmo composto (indicada somente nos trabalhos em que se refere à sua síntese) seria a seguinte:



Tratar-se-ia portanto dum éster do dimetilaminoetanóico e do ácido glucónico (no oxidrilo em C₆).

Parece contudo ter-se entrevisto vantagem, no que respeita à actividade terapêutica, em aumentar o número de radicais metilo, pelo que o produto sintético apresentado nos mercados sob o nome de Vitamina B₁₅ ou ácido pangâmico vem anunciado como tendo a seguinte estrutura:

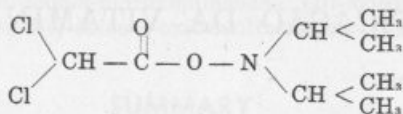


A acção terapêutica do APG parece ser evidente em casos de anoxia cardíaca, dores reumáticas e no alcoolismo agudo e crónico (*). Neste último caso, a actividade da Vitamina B₁₅ parece poder atribuir-se a um aumento de utilização do oxigénio nos tecidos, acelerando assim a oxidação do álcool etílico, e à existência de grupos metilo lábeis. Estes, além de uma acção lipotrópica (protegendo portanto o fígado da degenerescência adiposa), apressariam também a combustão do etanol nos parênquimas hepático e cerebral, mecanismo para o qual parece serem indispensáveis.

Em 1958, BENITO CASU e colab. (*), em face da falta de elementos de carácter químico do APG, resolveram fazer um estudo desta vitamina. Utilizaram a espectrofotometria do I.V. e chegaram a conclusões muitíssimo interessantes. Realizaram as suas experiências em preparados farmacêuticos do mercado. Verificaram assim a inexistência nesses preparados de uma substância de estrutura idêntica à de Krebs e a presença de uma mistura de duas ou três substâncias (em casos

menos frequentes) que identificaram. Tratava-se de ácido glucónico, glicocola (a mais rara) e dicloroetanoato de diisopropilamina.

Não parece despropositado atribuir a actividade terapêutica do ácido pangâmico a este último composto, visto continuarem a existir na sua estrutura metilos lábeis:



Para além do processo I.V. não era conhecido nenhum modo de identificação do APG. Quanto ao seu doseamento, o processo descrito era o tão importante quanto falível método de KJELDAHL.

Ocorreu-nos portanto experimentar o processo polarográfico que permitiria a análise qualitativa e quantitativa da Vitamina B₁₂. A tentativa teve êxito e vem, dentro de certa medida, comprovar os resultados do trabalho de BENITO CASU.

PARTE EXPERIMENTAL

Os polarogramas foram realizados com um aparelho da marca RADIOMETER - PO4. Como material padrão dispusemos de alguns gramas de Vitamina B₁₂, dispensada por um laboratório nacional de produtos farmacêuticos e com a qual esse laboratório prepara soluções injectáveis, e de uma pequena quantidade de dicloroetanoato de diisopropilamina puro. Ao primeiro padrão chamaremos A. Ao dicloroetanoato, padrão B. Como solução problema tínhamos uma solução injectável de APG que, segundo o rótulo, continha 10 mg/ml.

A partir dos dois padrões realizámos soluções aquosas a 1 g %.

A solução de fundo foi escolhida segundo os métodos habituais. Neste caso concreto o problema complicou-se um pouco, por razões que adiante exporemos, e que motivaram um grande número de ensaios, com as inevitáveis demoras.

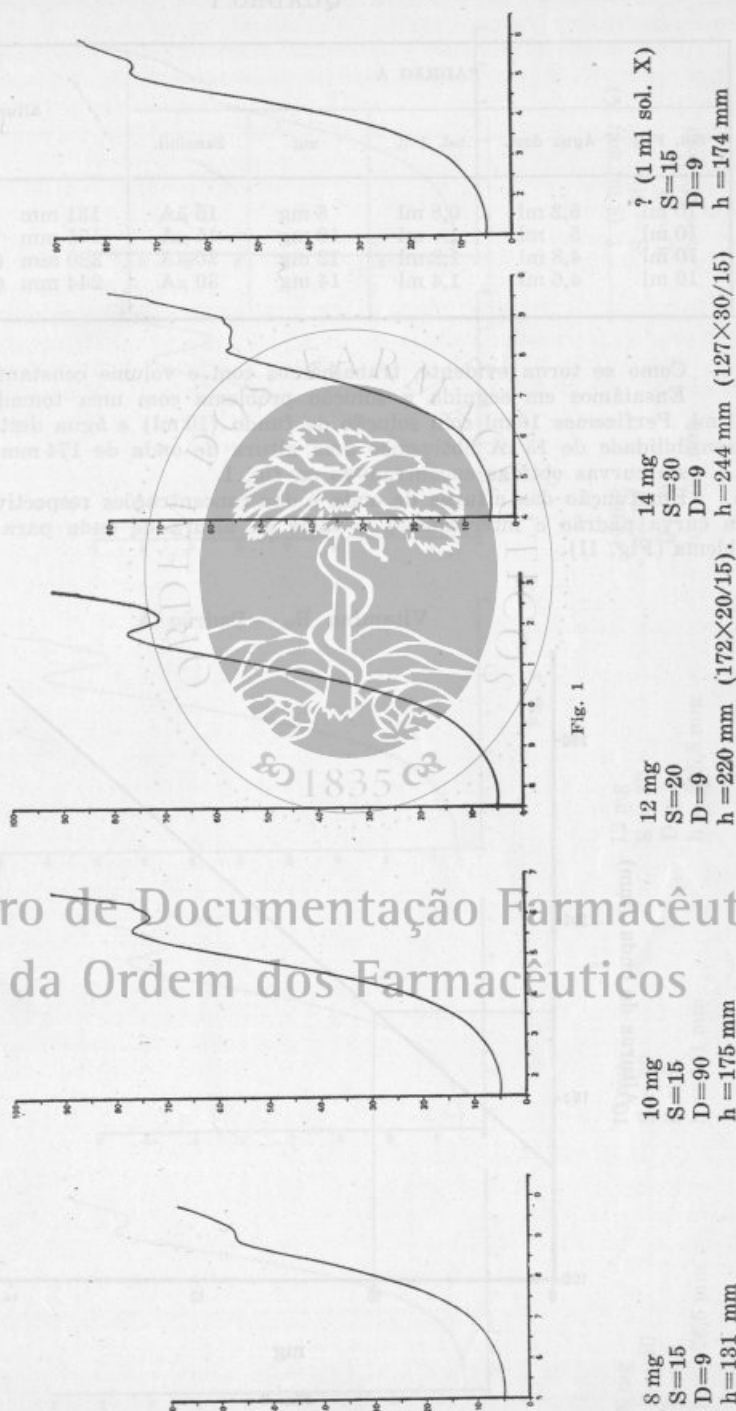
Começámos por tentar o meio ácido (ácido acético N/10) com resultado negativo. Tentámos o meio neutro (cloreto de potássio N/10) com o mesmo resultado. Passámos ao meio alcalino (amónia N/10 + cloreto de amónio N/10 — ãã) e verificámos o aparecimento de uma onda de redução da substância. Contudo, esta onda saía um pouco confusa em virtude da proximidade dos potenciais de redução da substância em estudo e da amónia. Visto que o meio alcalino parecia ser o eleito, experimentámos como solução de fundo a soda N/10, que tinha a vantagem da redução do ião sódio a um potencial mais alto. Mas não houve redução da Vitamina B₁₂. Pareceu-nos evidente a necessidade da presença de amónia para que a onda aparecesse, o que aliás não é inédito. De facto, a adição de amónia à solução de soda, provoca o aparecimento da onda do APG. Depois de diversos ensaios concluímos pela mistura de soda N/10 e amónia N/10 de 9/1, que nos satisfaz.

Para efeitos de mais fácil descrição chamaremos a esta solução de fundo FF₁.

Ensaíamos em primeiro lugar o padrão A. No quadro I estão inscritas as quantidades de solução de fundo, de água e de solução padrão que tomámos nos diversos ensaios. Preferimos para a análise quantitativa o método das curvas-padrão. Trabalhámos com diversas sensibilidades e portanto a altura das ondas teve de ser corrigida.

Utilizámos o amortecimento máximo, pelo que as curvas não apresentam praticamente o serrilhado característico. A velocidade de deslocamento do papel foi de 4 cm/min. Fizemos equivaler 0,05 volt a cada centímetro de papel. As sensibilidades indicadas dizem respeito a microAmpere/25 cm de papel.

(padrões A)



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

QUADRO I

PADRÃO A					Altura de onda
Sol. FF:	Água dest.	sol. 1 %	mg	Sensibil.	
10 ml	5,2 ml	0,8 ml	8 mg	15 μ A	131 mm
10 ml	5 ml	1 ml	10 mg	15 μ A	175 mm
10 ml	4,8 ml	1,2 ml	12 mg	20 μ A	220 mm (172 \times 20/15)
10 ml	4,6 ml	1,4 ml	14 mg	30 μ A	244 mm (127 \times 30/15)

Como se torna evidente, trabalhámos com o volume constante de 16 ml.

Ensaámos em seguida a solução problema com uma tomada de ensaio de 1 ml. Perfizemos 16 ml com solução de fundo (10 ml) e água destilada. Com uma sensibilidade de 15 μ A obtivemos uma altura de onda de 174 mm.

As curvas obtidas encontram-se na fig. I.

Em função das alturas de onda e das concentrações respectivas, construimos a curva padrão e interpolámos o valor da altura de onda para a solução problema (Fig. II).

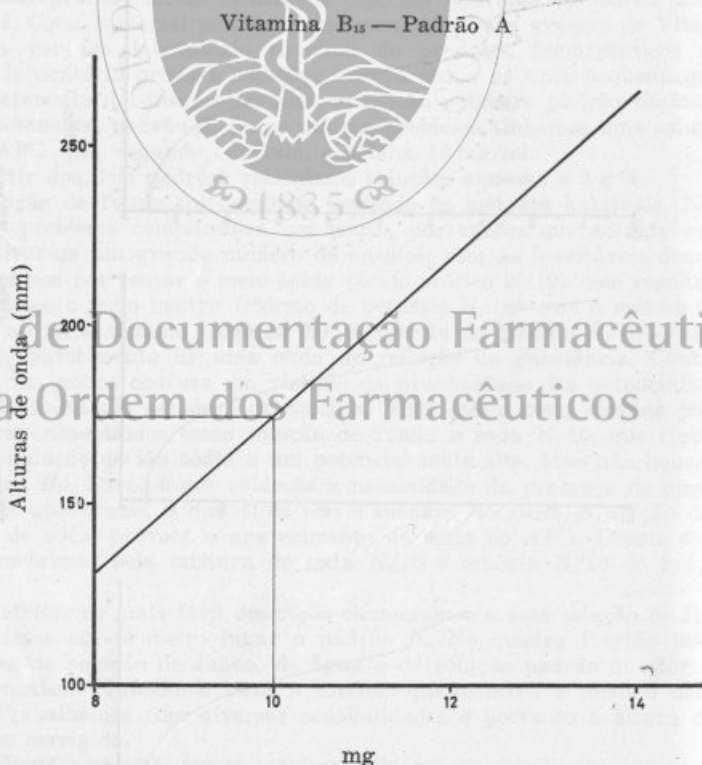
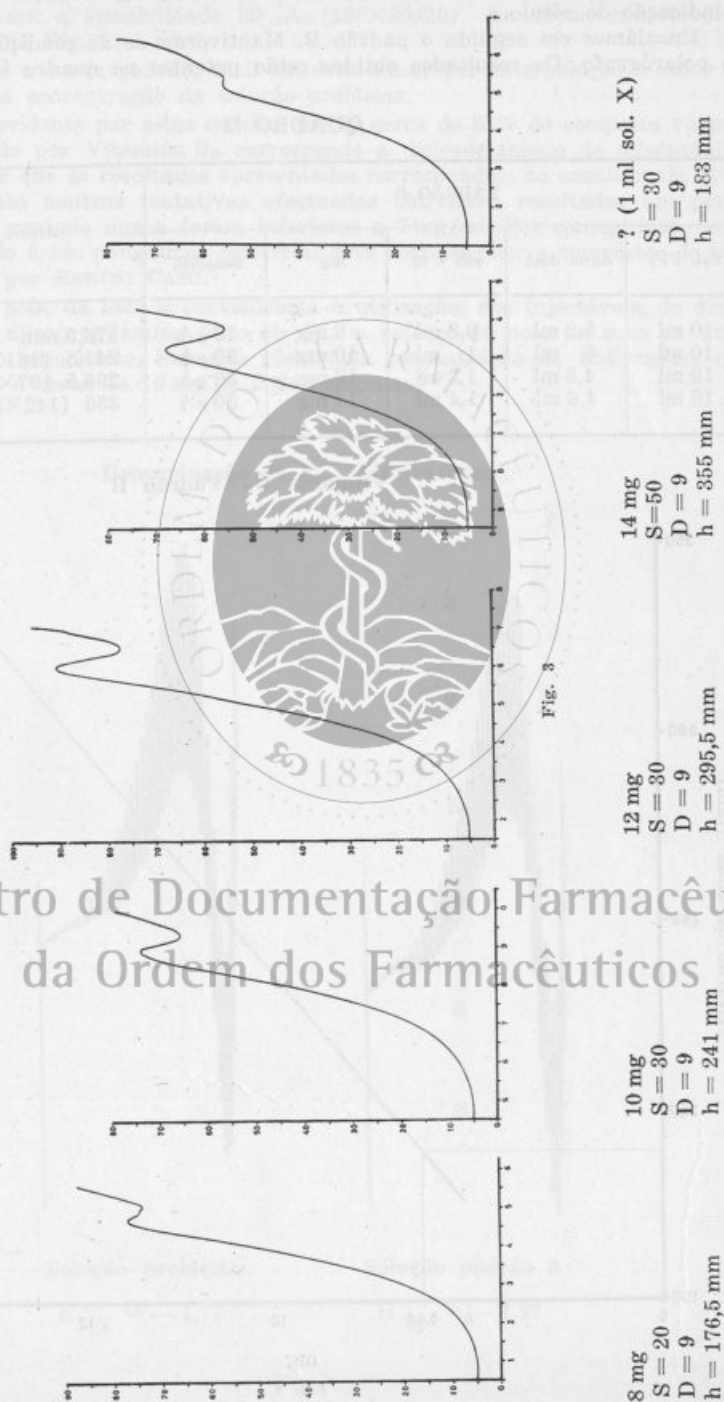


Fig. 2

Determinação da concentração de uma solução injectável de vitamina B₁₂

(padrões B)



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

A concentração encontrada é praticamente de 10 mg/ml o que vem confirmar a indicação do rótulo.

Ensaíamos em seguida o padrão B. Mantiveram-se as condições de trabalho no polarógrafo. Os resultados obtidos estão patentes no quadro II.

QUADRO II

PADRÃO B					Altura de onda
Sol. FF ₁	Água dest.	sol. 1 %	mg	Sensibil.	
10 ml	5,2 ml	0,8 ml	8 mg	20 μ A	176,5 mm
10 ml	5 ml	1 ml	10 mg	30 μ A	241,5 (161 \times 30/20)
10 ml	4,8 ml	1,2 ml	12 mg	30 μ A	295,5 197 \times 30/20)
10 ml	4,6 ml	1,4 ml	14 mg	50 μ A	355 (142 \times 50/20)

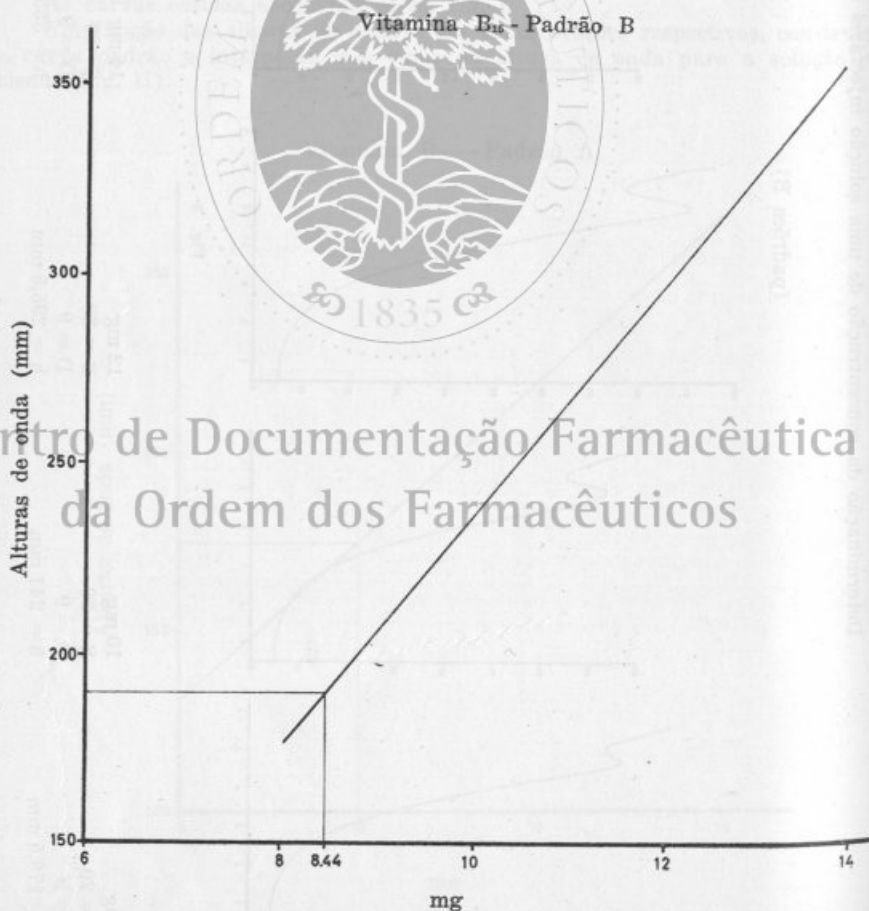


Fig. 4

O ensaio com a solução problema (tomada de 1 ml) deu uma altura de onda de 189 mm para a sensibilidade $30 \mu\text{A}$ ($126 \times 30 / 20$). As ondas encontram-se representadas na Fig. 3.

Construída a curva padrão, fácil foi determinar por interpolação o valor de 8,44 mg para a concentração da solução problema.

Torna-se evidente por estes ensaios que só cerca de 85% do composto vulgarmente conhecido por Vitamina B₁₂ corresponde a dicloroetanoato de diisopropilamina. De notar que os resultados apresentados correspondem ao ensaio mais favorável, porquanto noutras tentativas efectuadas obtivemos resultados um pouco diferentes que contudo nunca foram inferiores a 7 mg/ml. Por conseguinte, cerca de 15 a 30% do ácido pangâmico comercial deve corresponder a compostos do tipo dos indicados por BENITO CASU.

Supomos, pois, de toda a conveniência a utilização, nos injectáveis, de dicloroetanoato de diisopropilamina puro ou de um reforço de dose no caso da utilização do ácido pangâmico. Supomos ideal uma concentração de 12,5 mg/ml, que corresponderia a cerca de 10 mg de dicloroetanoato.

Determinação de $E_{\frac{1}{2}}$ (derivativas)



Solução problema

Solução padrão A

$$E_{\frac{1}{2}} = -1,77$$

$$E_{\frac{1}{2}} = -1,77$$

Fig. 5

Por simples curiosidade, que nos propomos desenvolver num próximo trabalho que pensamos fazer sobre este mesmo composto, efectuámos uma cromatografia em placa. Verificámos que o iodo revelava duas manchas resultantes de um depósito inicial de uma gota de APG, enquanto que uma gota de dicloroetanoato não apresentava mais do que uma mancha.

*
* * *

Quanto à identificação da Vitamina B₁₅ pelo processo polarográfico, não temos qualquer dúvida de que, quer no padrão A, quer no B, quer na solução injectável que nos serviu de problema, o composto reduzido é o dicloroetanoato de diisopropilamina, na medida em que os potenciais de semi-onda coincidem perfeitamente. Qualquer das soluções deu uma derivativa cujo pico ($E_{1/2}$) se situava em -1,77 volt, valor de potencial de onda média do princípio activo do ácido pangâmico. Os gráficos das Fig. V e VI assinalam tal valor.

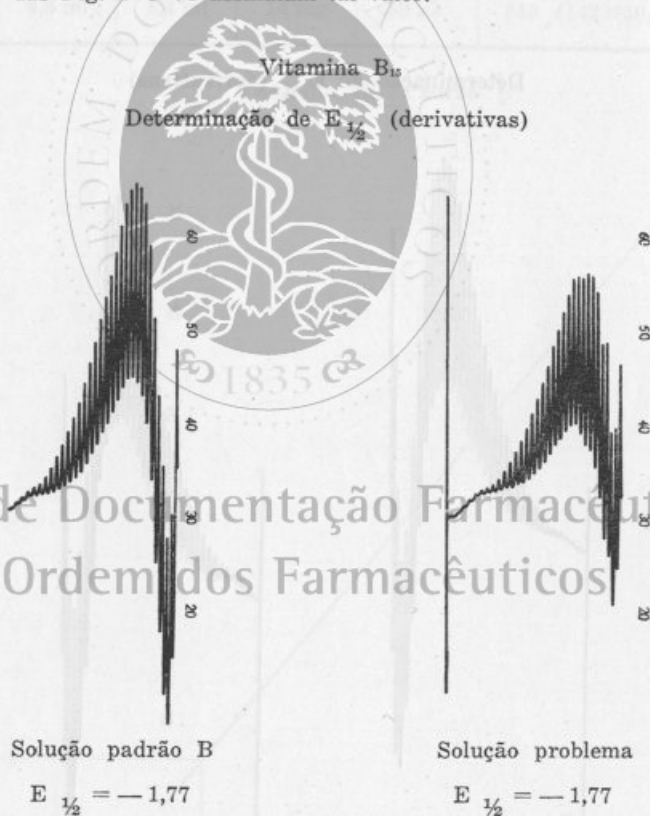


Fig. 6

SUMMARY

The reduction of A. P. G. and diisopropilamine dichloroetanoate at the dropping mercury electrode has been studied in several supporting electrolytes.

In 0,1M NaOH+0,1M NH₄OH (9:1), the A.A. obtained very well defined waves, the height of which is proportional to the concentration.

The half-wave potencial of the two substances is the same: —1,77 volt vs. the S. C. E.

BIBLIOGRAFIA

- (1) KREBS, E. T. e Colab.: *Intern. Record Med.* **164**, 18 (1951) e *Chem. Abst.* **46**, 4622 (1952).
- (2) KREBS, E. T. e Colab.: *U. S.* 2710876 (1955) e *Chem. Abst.* **50**, 5733 (1956).
- (3) G. VAILATI e Colab.: *Minerva Médica*, **83**, 3431 (1957).
- (4) CASU, BENITO e Colab.: *Boll. Chim. Farm.*, **97**, 3 (1958).



(Trabalho realizado no Laboratório de Análises Físico-Químicas da Faculdade de Farmácia do Porto).

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

PARTI EXPERIMENTAL

UTILIZAÇÃO DO FENÓMENO DA CROMODACRIORREIA COMO MÉTODO DE ENSAIO BIOLÓGICO DE MASSAS PARA SUPOSITÓRIOS

C. CORREIA DA SILVA
Professor Catedrático
da Faculdade de Farmácia do Porto

ANTÓNIO COSTA
1.º Assistente da Faculdade
de Farmácia do Porto
Bolseiro da I. A. C.

MARIA QUITÉRIA PAIVA
Licenciada em Farmácia

Conhecida a importância da absorção rectal dos medicamentos e as vantagens da sua utilização em diversas circunstâncias, é lógico o seu emprego como via de administração corrente em terapêutica. Entre nós a forma farmacêutica, supositório, tem uso frequente. No condicionalismo da absorção dos medicamentos administrados nesta forma, há que contar não só com a substância activa mas ainda com o veículo e que atender ao modo como neste aquela se acha incorporada. Uma vez que as massas de que se dispõe para a preparação de supositórios são hoje já numerosas e que está verificada a influência do excipiente na libertação das substâncias activas nele incorporadas, compreendemos que se inclua a capacidade de as libertar, entre as qualidades a exigir ao veículo.

Com este trabalho procuramos contribuir com um método farmacodinâmico simples para o estudo desta qualidade dos excipientes.

A cedência do medicamento é por vezes avaliada com o recurso a métodos «in vitro». Considera-se, no entanto, mais conveniente, por mais conforme com a realidade, o juízo formulado pela demonstração da absorção de substâncias. Esta verificação da passagem dum produto ao meio interno pode fazer-se recorrendo a técnicas químicas ou físico-químicas de identificação ou dosagem nos líquidos circulantes, nos tecidos ou nos excreta, ou com o emprego de métodos biológicos que incluem técnicas microbiológicas e farmacodinâmicas. São de igual modo numerosos os métodos que a literatura aponta em que se escolhe este critério para classificar os excipientes para supositórios quanto a esta qualidade, experimentando no animal e, por vezes, no homem.

Sendo assim elevado o número de métodos propostos, pode perguntar-se para quê então estudarem-se outros mais. A nós nos encorajou a afirmação de WHITWORTH: «There is a need for more in vivo testing of suppository bases and for investigation which will show any correlation between different methods».

PARTE EXPERIMENTAL

O método que indicamos utiliza a observação directa da cromodacriorreia. Empregámos nas experiências o rato branco (*Ratos norvegicus Berkenhout*, var. albinos) e apreciámos o tempo necessário para que surgisse aquele fenómeno, por acção do cloreto de carbaminoilcolina, na dose de 1 mg/Kg.

Preparámos os supositórios do seguinte modo: numa cápsula fundia-se o excipiente por aquecimento o mais moderado possível, a banho de água. O cloreto de carbaminoilcolina era dissolvido na água e este soluto incorporado no excipiente fundido, por agitação. O produto fundido, mas a temperatura vizinha da solidificação, era vertido em moldes que se colocavam seguidamente no frigorífico. O peso do supositório era em mg o correspondente ao peso do rato em g.. Escolhíamos lotes de animais cujo peso oscilava entre 150-300 g e que estavam em jejum de 24 horas (água ad libitum), a que introduzíamos o supositório a profundidade conveniente e cuja expulsão evitávamos aplicando pinças. Antes da introdução do supositório, limpávamos de fezes a porção terminal do recto, o que se consegue facilmente por manipulação digital. Anotávamos o tempo necessário para o aparecimento de cromodaciorreia. Por vezes aparece no focinho secreção corada que não considerámos.

Os supositórios foram preparados utilizando as fórmulas que a seguir indicamos:

Manteiga de cacau		Massa estearinum BB		G 31/33 M	
Mant. de cacau	80%	M. estearinum	80%	G 31/33 M	90%
Lanolina	10%	Lanolina	10%	Água	10%
Água	10%	Água	10%		

G 33/35 M		G 35/37 M		G 37/39 M	
G 33/35 M	90%	G 35/37 M	90%	G 37/39 M	90%
Água	10%	Água	10%	Água	10%

Base 1		Base 2		Base 3	
Carbowax 4000	33%	Carbowax 1500	33%	Carbowax 1000	86,4%
Carbowax 6000	47%	Carbowax 6000	47%	Carbowax 4000	3,6%
Água	20%	Água	20%	Água	10%
Base 4		Base 5			
Carbowax 1000	67,5%	Carbowax 1500	10%		
Carbowax 4000	22,5%	Carbowax 6000	63%		
Água	10%	Água	27%		

Nota — As fórmulas das bases que no quadro têm * correspondem às anteriores mas as massas foram fornecidas por casas diferentes.

No quadro junto vão inscritos os resultados obtidos.

Excipientes Ratos	Manteiga de cacao	Massa Estearinum BB	G		G		G		G	
			31/33 M	33/35 M	35/37 M	37/39 M	31/33 M	33/35 M	35/37 M	37/39 M
1	5,5	N	2	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	2,5	3,5	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	12
4	N	7,5	N	N	N	N	N	N	N	N
5	9,5	3,5	1,5	1,5	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	2,5	N	N	N	N	N	N
7	3,5	14	5	4	N	N	N	N	N	N
8	9	N	N	N	N	4	N	N	N	N
9	N	N	2,5	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	2,5	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	14	3	2,5	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	3	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	4,5	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	2	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	7	N	N	N	N
19	N	8	4	3,5	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Base 1	Base 2	Base 3	Base 4	Base 5	Base 1*	Base 2*	Base 3*	Base 4*	Base 5*
5,5	6	6	4	13	5	4,5	8	5	5
9	4,5	6,5	8	11	5	6	6	3	5,5
4	6	3,5	6,5	8,5	5	2,5	8	4,5	9,5
8	5	3,5	17	13	9	3,5	8,5	5	8,5
7,5	5,5	6	3,5	11	8,5	4	10	5	8
5,5	11	5	8	5	8,5	6,5	9	9	5,5
7,5	11	4,5	4	9,5	3,5	10,5	7,5	8,5	9
3,5	7	5	5	10	8	8	6,5	4,5	4
4,5	8	4,5	7	5	4	9,5	8,5	5,5	11
6	9	4	3	8,5	8	7	8	7	7

MÉDIAS

6,1	7,3	4,9	6,6	9,5	6,5	6,2	8	5,7	7,3
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	-----	-----

O tempo que levou a aparecer a cromodaciorreia é indicado no quadro em minutos.
N = não apareceu cromodaciorreia até 20 minutos depois da aplicação do supositório.

CONCLUSÕES

Temos a convicção de que o processo ensaiado é de sugerir aos farmacêuticos a quem este problema interesse, dada a sua grande simplicidade e o facto de não necessitar de qualquer aparelhagem, tendo ainda a vantagem de utilizar animais sem anestesia ou qualquer outra preparação, os quais podem servir em vários ensaios.

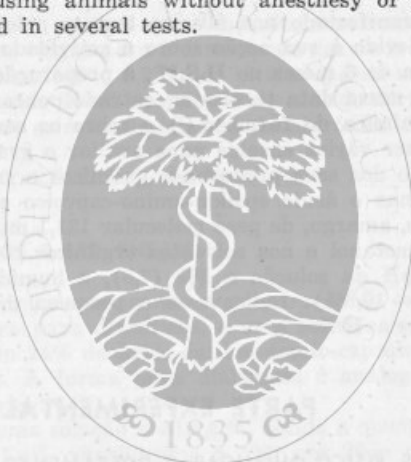
SUMMARY

Based on the chromodacryorrhea phenomenon, the AA. settled a control method for the suppositories' excipients.

The nowadays wide use of this pharmaceutical preparations in the administration of drugs with general action, the diversity of weights and the controversial advices relating to the choose criterion of the same, lend us to study this extremely simple pharmacodinamic technique.

They prepared carbacol suppositories with hidrophile and lipophile weights that were experimented on the albino rat, measuring the time needed for the appearance of the chromodacryorrhea.

They are convinced that it is worthy of suggesting the use of the assayed technique to the pharmaceutics to whom this problem is related, considering its great simplicity and the fact of did not needing any kind of equipment, still having the advantage of using animals without anesthesia or any other preparation, so they can be used in several tests.



(Trabalho realizado no Centro de Estudos Farmacológicos do Instituto de Alta Cultura).

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

NOTA SOBRE O DOSEAMENTO DO ÁCIDO-EPSILON-AMINO-CAPROICO E SEUS PREPARADOS GALÉNICOS

M. HELENA DIAS AGUDO

M. MANUELA LUZ CLARA

M. LUÍSA DOS SANTOS

Assistentes dos Serviços Farmacêuticos do H. S. M.

Chefe dos Serviços
Farmacêuticos do H. S. M.

O interesse manifestado nos últimos tempos pelo emprego do ácido epsilon-amino-caproico, devido à sua acção sobre a actividade fibrinolítica do sangue (¹), levou-nos, há cerca de 6 meses no H.S.M., à preparação da sua solução injectável.

Pelo facto de nessa data termos encontrado poucas referências bibliográficas sobre a análise química do fármaco (²) e sobre os seus preparados vimos-nos na necessidade de fazer vários ensaios para avaliar o grau de pureza da substância e também o estudo dos seus preparados galénicos e sua estabilidade.

Citava-se apenas o ácido epsilon-amino-caproico como um pó branco, micro-cristalino, inodoro, amargo, de peso molecular 131,1 muito solúvel na água (80%), pouco solúvel no metanol e nos solventes orgânicos.

Referia-se o pH da solução a 5% (7,5), a humidade (inferior a 0,3%) e o azoto total (10,5 — 10,8%). Indicava-se a pesquisa de cloretos, sulfatos, metais e ferro, na solução a 10%.

PARTE EXPERIMENTAL

I — PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DOSEAMENTO

Os valores encontrados para o ponto de fusão, (monobloco modelo Monocop IV) tanto nas amostras ensaiadas (A.E.C. e Light) como no produto depois de recristalizado (dissolução em água quente e diluição em álcool) estão compreendidos entre 210 e 215°, sendo, de certo modo, influenciados pela velocidade de aquecimento.

Confirmámos as solubilidades descritas e o valor do pH da solução a 5%.

A humidade, com o produto seco a 105° durante 4 h., ainda foi inferior à percentagem referida (cerca de 0,08%).

À falta de indicação de reacções específicas para a identificação do produto, ensaiámos a reacção da ninidrina: em cápsula de porcelana pôr uns miligramas do pó e umas gotas de solução a 0,2% de ninidrina em acetona; obtém-se uma coloração roxa.

Como esta reacção é comum a todos os amino-ácidos, tentámos umas outras já anteriormente experimentadas para o cloreto de lisina.

Assim, o soluto a 5% não cora pelo reagente de Nessler, dá coloração azul com o sulfato de cobre, acastanhada com o cloreto de férrico diluído, não pp. pelo sal de Reinecke e pp. pelo ácido sílico-tungstico (pp. solúvel em excesso de reagente).

Adaptámos para o ácido-epsilon-amino-caproico uma reacção descrita também para o cloridrato de lisina (³) com acetona, nitroprussiato de sódio e borato de sódio: obtem-se coloração violeta.

Pesquisamos cloretos, sulfatos, metais diversos e ferro, como estava referido, (não encontramos, porém nenhuma destas impurezas) e as substâncias orgânicas carbonizáveis à maneira habitual: 0,1 g da substância mais 3 ml de ácido sulfúrico, não deu coloração amarela.

Pelo facto de estar descrita no projecto de monografia do ácido glutâmico para a Adenda da F. Port., e ainda nas referências sobre a análise da lisina⁽²⁾ (que como se sabe é o ácido-epsilon-diamino-caproico), resolvemos incluir na verificação de pureza da substância, uma cromatografia em papel: partimos do soluto aquoso a 2,5% e depositámos 0,002 ml desta solução em folha de papel Whatman n.º 1. Efectuámos o ensaio cromatográfico, empregando técnica ascendente, usámos como líquido desenvolvvente a mistura ácido acético-álcool butílico-água (5:4:1) e revelámos com solução de ninidrina ao fim de 24 horas.

A mancha situou-se a cerca de 30 cm acima da linha de partida.

O cromatograma mostrou uma mancha de cor violeta e não apresentou manchas de outros amino-ácidos.

Para o doseamento do ácido epsilon-amino-caproico ensaiamos, com bons resultados, a técnica de SORENSEN, vulgar para o doseamento dos amino-ácidos, operando nas seguintes condições: dissolver $\pm 0,25$ g do ácido epsilon-amino-caproico em 20 ml de água destilada; juntar 40 ml de solução de aldeído fórmico neutralizada à fenoltaleína e titular com solução decinormal de hidróxido de sódio, até coloração rosa nítida.

1 ml da solução N/10 $\langle \rangle$ 0,0131 g do ácido.

2 — PREPARADOS GALÉNICOS E SEU ENSAIO

H. LEHMANN⁽⁴⁾ descreveu recentemente a preparação de soluções para o uso oral, uma açucarada e outra para diabéticos, e uma solução injectável.

A poção descrita contém 24% de ácido-epsilon-amino-caproico, sacarina, ácido cítrico e xarope de cerejas. A forma para diabéticos é análoga à anterior mas sem xarope nem ácido cítrico.

A solução injectável é uma solução a 40,4 g %, obtida a quente; o Autor refere o emprego de ampolas de 5 ml, esterilizadas a 120° por 20 m e faz notar que a solução é incompatível com a levulose mas compatível com glucose e o cloreto de sódio, podendo portanto, ser administrada com os injectáveis de grande volume habituais.

No H.S.M. já anteriormente tinham usado uma solução simples da droga, preparado na ocasião do emprego; mas começámos depois a preparar uma poção, baseada na técnica de LEHMANN, atrás referida, e que é a seguinte:

Ácido epsilon-amino-caproico	125 g
Ácido cítrico	3 g
Essências de cerejas	1 g
Álcool	25 ml
Ortossulfimida benzoica	0,05 g
Água destilada nipagenada	160 g
Xarope comum q. b. p. ^a	500 ml

Ao mesmo tempo foi-nos também pedida a solução injectável e, assim, procedemos à sua preparação seguindo a técnica do autor suíço mas usando frascos com 25 ml e empregando 0,1% de carvão como despirogenizante e adjuvante de filtração.

O produto fica incolor e com pH vizinho de 7,5 (antes e depois da esterilização).

Para a determinação quantitativa do injectável e da poção, utilizámos satisfatoriamente a técnica de SORENSEN, referida para a droga, após diluição prévia

dos preparados galénicos, 20 e 10 vezes respectivamente, e tomando um volume equivalente a cerca de 250 mg. da droga.

No intuito de tentar verificar a estabilidade do injectável ao calor, e também a estabilidade da poção conservada à temperatura ambiente durante cerca de oito meses, efectuámos cromatografias em papel pela técnica já referida, da sol. inجت. antes e após esterilização, e da preparação mais antiga das mesma poção. Os resultados obtidos, quanto à cromatografia, mostram que não apareceu nenhuma mancha além da característica do ácido epsilon-amino-caproico e a diferença dos resultados do método volumétrico não foram significativos.

CONCLUSÕES

- 1) O ácido epsilon-amino-caproico tem ponto de fusão compreendido entre 210 e 215° e em cromatografia em papel — desenvolvente: mistura ácido acético álcool butílico — água (5:4:1) — apresenta um RF vizinho de 0,77.
- 2) O método de SORENSEN permite o doseamento não só da droga, como dos seus preparados galénicos.
- 3) A solução injectável pode ser autoclavada e poção apresenta boa estabilidade, o que foi confirmado por cromatografia em papel.

SUMMARY

Lately, on the Hospital de Sta. Maria, the doctors become greatly interested about the use of Σ -aminocaproic acid parenteral preparations, looking for his action over the fibrinolytic activity of blood. We decided to perform assays about the analysis of the compound and his galenic mixtures.

Once that there was a lack of elements about analysis, w tried to use previously known methods, applicable to the aminoacids. So we propose for the compound and respective galenic mixtures the Sørensen's method that afforded satisfying results.

The ascending paper chromatography pointed out for the compound, parenteral preparation, and for a liquid preparation destined to oral usage, the same Rf.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) M. MYAMOTO e K. LEE: *J. Pharm. Sci.* 51, 912 (1962).
- (²) Folheto da Soc. A. E. C. (França).
- (³) Suplemento da Farm. Franc.
- (⁴) H. LEHMANN: *Schw. Apoth. Ztg.* 101, 792 (1963)

(Trabalho efectuado nos Serviços Farmacêuticos do Hospital de Santa Maria).

NOTA SOBRE A UTILIZAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO NO CONTROLE RÁPIDO DE PREPARADOS GALÉNICOS LÍQUIDOS

MARIA MANUELA DA LUZ CLARA

MARIA MANUELA LEITE INÁCIO

Assistente dos Serviços Farmacêuticos do H. S. M.

Licenciada em Farmácia

É já bem conhecido que o índice de refração é uma constante física característica de qualquer substância e que a sua determinação apresenta um grande interesse sob o ponto de vista da verificação da pureza.

Nas misturas, a medida do índice de refração está relacionada com as proporções relativas dos componentes nas diferentes concentrações, permitindo uma dosagem rápida e suficientemente exacta dos mesmos.

Assim, tem sido aplicada a determinação desta constante em vários campos: na dosagem de essências, na avaliação da natureza e da percentagem das falsificações dos óleos e gorduras; na determinação da gordura do leite (método de WOLLNY) e na apreciação rápida da adição de água no leite e em análises clínicas, por exemplo, na dosagem da glucose no sangue, na determinação das proteínas no soro, e no doseamento de albumina na urina.

Há já dois anos que vimos utilizando a determinação do índice de refração como controle de rotina das preparações líquidas e especialmente injectáveis durante a fase de preparação.

Há menos de um ano sobretudo autores alemães (*) vêm referindo para injectáveis de grande volume a determinação desta constante e mais recentemente, referem-se ao mesmo assunto especialmente em soluções injectáveis de açúcares e polialcoois (**).

Os nossos ensaios foram efectuados sistematicamente em injectáveis aquosos e oleosos e preparações líquidas simples e complexas.

A título de exemplo apresentamos nos quadros I, II e III os valores encontrados respectivamente em alguns injectáveis aquosos, injectáveis oleosos e preparações líquidas não injectáveis.

Em injectáveis da mesma substância usadas em concentrações diversas, determinámos o índice de refração e verificámos que havia proporcionalidade entre esta constante e a correspondente concentração sendo perceptíveis diferenças de 10%. No caso da vitamina C, vitamina B₁, glucose, cloreto de sódio, niquetamida, os gráficos estabelecidos mostram-se recta bem definidas. As figuras 1 e 2 constituem exemplos típicos.

Para termos uma ideia da variação do índice de refração como apreciação de pequenas diferenças de concentração fizemos a adição de 10% de água a algumas soluções complexas e verificámos a variação do índice de refração.

Os valores obtidos encontram-se no quadro IV.

Verificámos que soluções de substâncias diferentes mas de estrutura vizinha ou não, na mesma concentração tem índice de refração próximo, facto este que foi assinalado para os açúcares e polialcoois por autores alemães.

Esta determinação tem sobretudo interesse analítico para soluções de fármacos utilizados em concentrações elevadas.

As soluções injectáveis aquosas em concentração fraca têm praticamente o índice de refração da água.

As soluções injectáveis oleosas têm praticamente o índice de refração do azeite, daí o pouco interesse desta determinação nestes casos.

QUADRO I

Nome	Concentração em g por cento	Índice de refração
ácido fólico	1,5	1,3370
semi - carbazona do adre- nocromo	0,05	1,3360
citrato de sódio	3,8	1,3390
cloreto de papaverina	2,0	1,3375
» de papaverina	5,0	1,3640
» de procaína	1,0	1,3340
» de procaína	2,0	1,3390
» de procaína	5,0	1,3435
» de quinino	30,0	1,4110
fenobarbital sódico	10,0	1,4220
nicotinamida	10,0	1,3510
mersalil	10,0	1,3530
nicotinato de sódio	3,0	1,3395
isoniazida	5,0	1,3435
P.A.S. sódico	20,0	1,3710
Sulfatiazol	20,0	1,3710
Tartarato de sinefrine	6,0	1,3345
Vitamina B6	2,5	1,3380

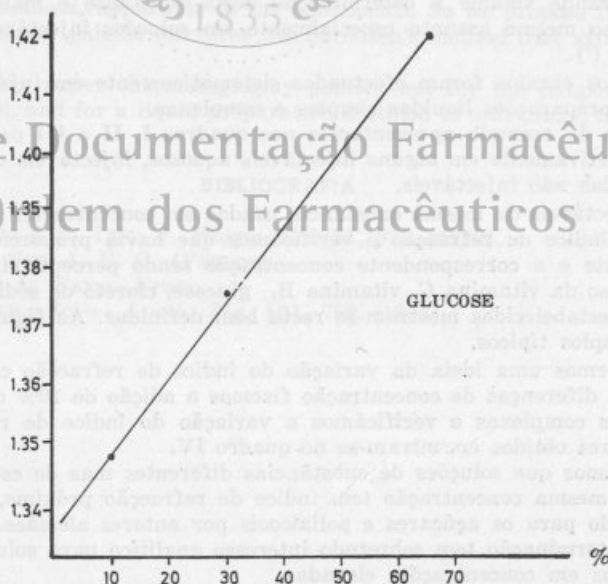


Fig. 1

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

QUADRO II

Nome	Concentração em g por cento	Índice de refração
acetato desoxicorticosterona	1	1,4740
benzoato estradiol	0,1	1,4710
» »	0,5	1,4730
progesterona	0,5	1,4770
propionato estilbestrol	0,1	1,4675
» estilbestrol	0,5	1,4680
» testosterona	0,5	1,4695
» testosterona	1,0	1,4700
quinino e essências		1,4690
vitamina A	50.000 μ /ml	1,4680

QUADRO III

	Índice de refração
xarope de complexo B	1,4350
xarope de di-ter-butilnaftaleno-sulfonato de sódio	1,442-1,444
xarope de piperazina	1,4265
quina fosfatada	1,3590
solução oral de tartarato de sinefrina	1,3575-1,3585
solução polivitamínica	1,4325-1,4350
solução de mafenide e sulfato de tuamino-heptano	1,3410

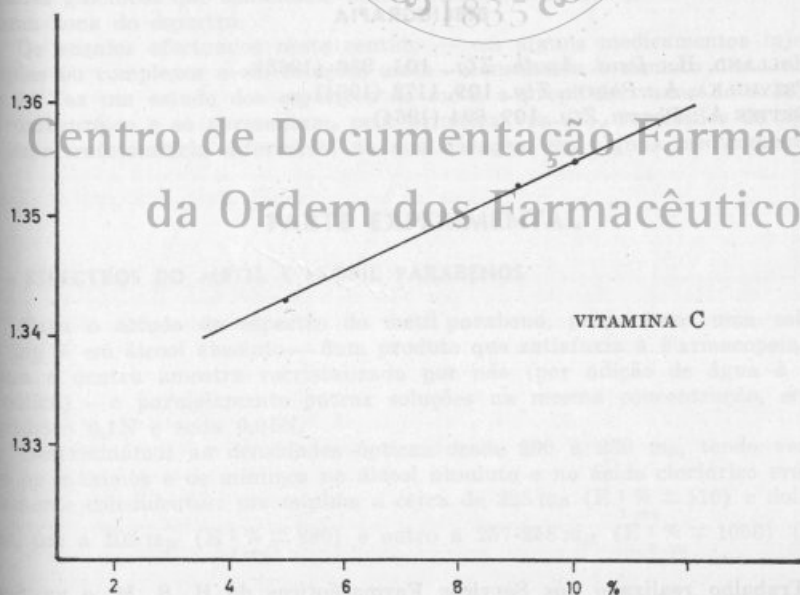


Fig. 2

QUADRO IV

xarope de complexo B	1,4350	1,4250
xarope de piperazina	1,4265	1,4180
solução polielectrolítica glu- cosada	1,3410	1,3400

CONCLUSÕES

De harmonia com os resultados destes ensaios e com a nossa experiência já de bastante tempo, no controle de rotina dos diferentes lotes do mesmo medicamento, aconselha-se a inclusão da determinação do índice de refração nas fichas de controle de preparados líquidos e complexos.

SUMMARY

It was known that the refraction index of the solutions depended of the concentration of the dissolved substances. However, the utilization of this physical determination in liquid galenic mixtures, never had been used as routine on the rapid verification of drugs.

From about two years ago than the AA. had been using this determination on the verification of simple and complex parenteral preparations, mainly, as previous control on the manufacturing act.

Lately, german AA. on refer to the same subject mainly in parenteral preparations of sugars and polyols.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) HOLLAND, H.: *Deut. Apoth. Ztg.*, **103**, 936 (1963).
 (²) PRZYHILKA, A.: *Pharm. Ztg.*, **109**, 1172 (1964).
 (³) DETTER A.: *Pharm. Ztg.*, **109**, 694 (1964).

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

NOTA SOBRE O DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DOS PARABENOS EM PREPARADOS GALÉNICOS

A. MARQUES LEAL

M. MANUELA LEITE INÁCIO

M. AMÉLIA ANDRADE

Licenciados em Farmácia

Em 1960 INTONTI e colaboradores (*) num trabalho sobre pesquisa e dosagem espectrofotométrica de certos conservantes em bebidas alcoólicas refere que a solução aquosa de metilparabeno tem um máximo a 255 $m\mu$; e TRIFIRO (†) também num trabalho sobre dosagem de conservantes, refere o espectro em solução alcoólica do mesmo composto e dos outros ésteres vizinhos.

A técnica habitual de dosagem dos parabenos em preparados galénicos consiste, em geral, numa extracção pelo éter em meio ácido, seguida de pesagem do extracto etéreo, técnica que utilizamos em alguns preparados galénicos, mas que apresenta a desvantagem de ser muito demorada.

Há já bastante tempo que vínhamos utilizando como complemento da verificação da pureza do p. hidroxibenzoato de metilo a determinação do máximo a 257-258 $m\mu$ em solução alcoólica a 0,5 mg %.

Por paralelismo com outros compostos fenólicos (‡) admitimos a hipótese de que o seu espectro em meio alcalino fosse diferente do em meio ácido e pudesse permitir, por espectrofotometria diferencial, a dosagem dos parabenos em preparados galénicos que contenham outras substâncias que apresentem absorção na mesma zona do espectro.

Os ensaios efectuados neste sentido — em alguns medicamentos injectáveis simples ou complexos e em soluções orais — constituem o assunto desta nota, em que se faz um estudo dos espectros do metil e propil-derivados do ácido parahidroxibenzóico e se apresentam, pela primeira vez (*), resultados de aplicação da espectrofotometria diferencial na sua dosagem em alguns medicamentos.

PARTE EXPERIMENTAL

1 — ESPECTROS DO METIL E PROPIL PARABENOS

Para o estudo do espectro do metil parabeno, preparámos uma solução a 0,5 mg % em álcool absoluto — dum produto que satisfazia à Farmacopeia Portuguesa e doutra amostra recristalizada por nós (por adição de água à solução alcoólica) — e paralelamente outras soluções na mesma concentração, em ácido clorídrico 0,1N e soda 0,01N.

Determinámos as densidades ópticas desde 200 a 230 $m\mu$, tendo verificado que os máximos e os mínimos no álcool absoluto e no ácido clorídrico eram praticamente coincidentes: um mínimo a cerca de 225 $m\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} \pm 110$) e dois máximos, um a 203 $m\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} \pm 890$) e outro a 257-258 $m\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} \pm 1050$) (fig. 1).

(*) Agradecemos à nossa colega Dr.^a Ausenda Quintão, do Lab. Sanitas, a busca bibliográfica que amavelmente efectuou no «Chemical Abstracts».

O espectro em soda centinormal mostrou-se nitidamente diferente, com dois máximos, a $220\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} \pm 560$) e a $296-297\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1500$) e um mínimo a $245\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} \pm 90$) (fig. 1).

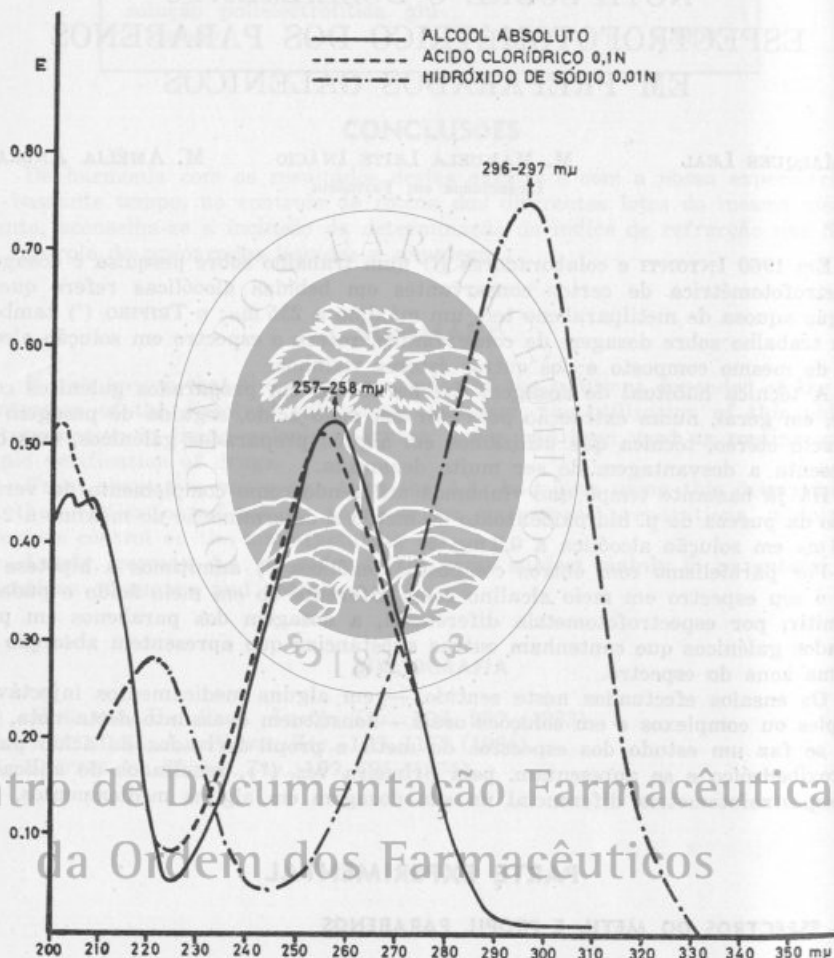


Fig. 1

Na verificação da lei de Beer, utilizando a solução alcoólica e a leitura a $257-258\text{ m}\mu$, observámos que as extinções são proporcionais às concentrações na zona vizinha de $0,5\text{ mg}\%$ (fig. 2).

O espectro do propilparabeno, em meio alcoólico, apresenta um máximo principal na mesma zona com extinção específica um pouco mais baixa ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 900$) verificando-se igualmente a lei de Beer, nas mesmas concentrações.

Como o espectro em soda $0,01\text{N}$ se mostrou de modo a admitir a espectrofotometria diferencial, efectuámos com o metilparabeno o espectro da solução alcalina contra a solução ácida, entre 205 e $330\text{ m}\mu$.

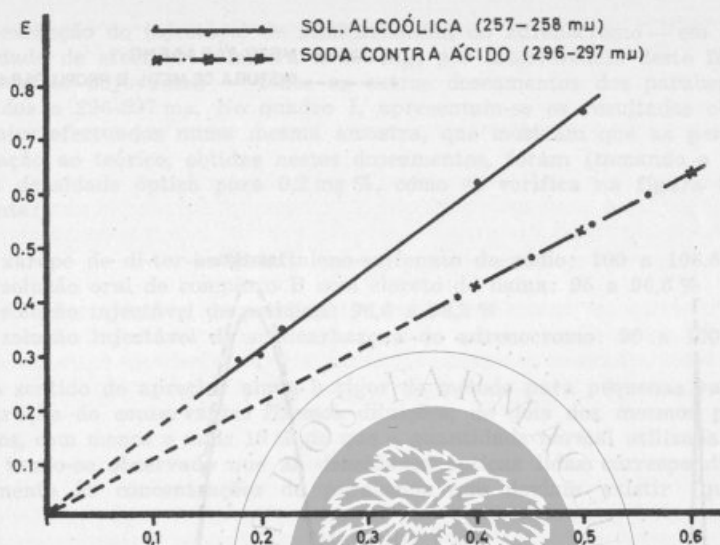


Fig. 2

Conforme se verifica na figura 3 este espectro não é contínuo e apresenta três máximos: um a 210 $m\mu$, outro a 223 $m\mu$ e outro principal a (fig. 3) 296-297 $m\mu$ ($E \frac{1\%}{1\text{cm}} = 1500$). (Fig. 3)

O espectro obtido, do mesmo modo, com a mistura de metil e propilparabeno (9+1) foi quase coincidente.

Com o intuito de verificarmos a proporcionalidade entre as concentrações e as extinções lidas preparámos soluções de metilparabeno a 0,18; 0,2; 0,22; 0,4 e 0,5 mg %, em ácido clorídrico 0,1N e soda 0,01N, e lemos no espectrofotómetro a 296-297 $m\mu$, pois as leituras neste comprimento de onda apresentam maior interesse, visto haver menor probabilidade de interferência de outros compostos.

A figura 2 mostra que se verifica também a lei de Beer na espectrofotometria diferencial, neste comprimento de onda.

2 — APLICAÇÃO AO DOSEAMENTO DE PREPARADOS GALÉNICOS LÍQUIDOS

Embora fosse pouco provável a utilização desta técnica de doseamento dos parabenos, quando utilizados como conservantes de medicamentos contendo compostos que apresentam variações de espectro em meio alcalino, experimentámos o processo em soluções injectáveis de vitamina B₁ em soluções injectáveis e orais de tartarato de oxedrina e também na solução milesimal de levorrenina. Os resultados foram, evidentemente, negativos, pela impossibilidade de efectuar correctamente as leituras no espectrofotómetro.

Resultados bastante satisfatórios foram, pelo contrário, obtidos com um xarope de di-ter-butyl-naftaleno-sulfonato de sódio, solução injectável de petidina, solução oral de complexo B com cloreto de lisina e ainda com um injectável de semicarbazona do adrenocromo, medicamentos em que costumamos utilizar estes conservantes, e, em que a sua dosagem era efectuada pela técnica clássica de extracção.

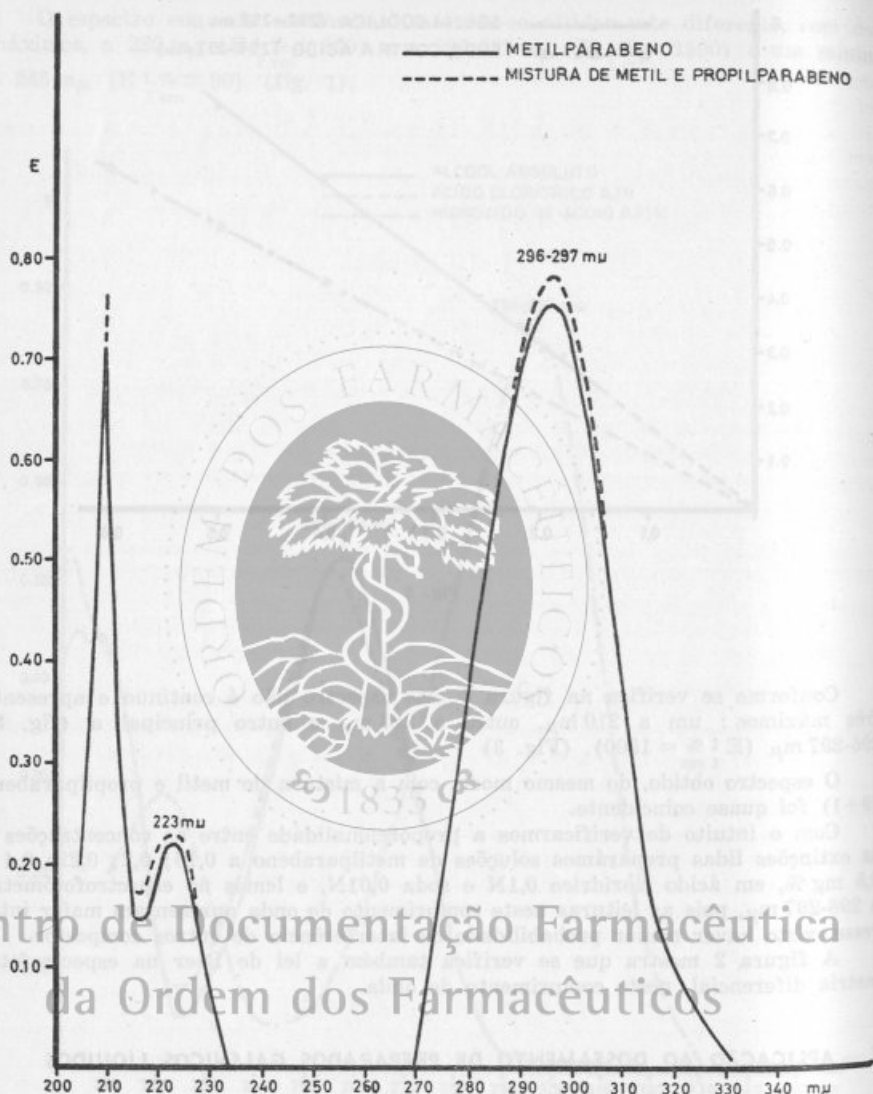


Fig. 3

Para tanto, começámos por preparar os referidos medicamentos, sem os conservantes, e verificámos que, na diluição adequada para a espectrofotometria diferencial dos parabenos, a extinção na zona vizinha de 296-297 $m\mu$ era praticamente igual em meio alcalino e em meio ácido, isto é, a solução alcalina lida contra a solução ácida dava absorção nula.

Em todos os mesmos preparados, mas contendo o conservante, ou conservantes, efectuámos diluições em soda 0,01N e em ácido clorídrico 0,1N de modo a obter uma concentração final de cerca de 0,2 mg % em parabenos totais.

À excepção do injectável de semicarbazona do adrenocromo — em que houve necessidade de efectuar a leitura a 295 m μ , por interferência deste fármaco ou dos restantes adjuvantes — todos os outros doseamentos dos parabens foram efectuados a 296-297 m μ . No quadro I, apresentam-se os resultados obtidos, em 10 ensaios efectuados numa mesma amostra, que mostram que as percentagens, em relação ao teórico, obtidas nestes doseamentos, foram (tomando o valor 0,30 como a densidade óptica para 0,2 mg %, como se verifica na figura 2) respectivamente:

- xarope de di-ter-butil-naftaleno-sulfonato de sódio: 100 a 106,6 %
- solução oral de complexo B com cloreto de lisina: 95 a 96,6 %
- solução injectável de petidina: 96,6 a 98,3 %
- solução injectável de semicarbazona do adrenocromo: 90 a 100 %.

No sentido de apreciar ainda o rigor do método para pequenas variações de concentração do conservante, fizemos diluições, de dois dos mesmos preparados galénicos, com menos e mais 10 % do que a quantidade normal utilizada no doseamento, tendo-se observado que as densidades ópticas lidas correspondiam quase exactamente às concentrações de parabens que deviam existir (quadro II).

QUADRO I

ENSAIOS	Xarope de di-ter-butil-naftaleno-sulfonato		Solução oral de vitaminas B+cloreto de lisina		Solução injectável de cloreto de petidina		Solução injectável de semicarbazona do adrenocromo	
	extinção lida	% em relação ao teórico	extinção lida	% em relação ao teórico	extinção lida	% em relação ao teórico	extinção lida	% em relação ao teórico
1	0,32	106,6	0,29	96,6	0,295	98,3	0,27	90,0
2	0,31	103,3	0,29	96,6	0,29	96,6	0,27	90,0
3	0,31	103,3	0,285	95,0	0,29	96,6	0,275	91,6
4	0,305	101,6	0,29	96,6	0,295	98,3	0,28	93,3
5	0,32	106,6	0,295	98,3	0,29	96,6	0,285	95,0
6	0,315	105,0	0,29	96,6	0,295	98,3	0,29	96,6
7	0,305	101,6	0,29	96,6	0,29	96,6	0,295	98,3
8	0,31	103,3	0,285	95,0	—	—	2,29	96,6
9	0,30	100,0	0,29	96,6	—	—	0,30	100,0
10	0,30	100,0	0,29	96,6	—	—	2,95	98,3

QUADRO II

Concentração teórica dos parabens em mg %	Extinção lida	
	Sol. inject. de semicarbazona do adrenocromo	Sol. oral de vitaminas B+cloreto de lisina
0,18	0,27	0,28
0,20	0,305	0,31
0,22	0,34	0,34

CONCLUSÕES

1. O espectro no U. V. do metil e do propilparabeno, em soda 0,01N, apresenta em relação ao obtido com a solução alcoólica e a solução clorídrica 0,1N um afastamento do máximo da zona de 257-258 $m\mu$ para a zona de 296-297 $m\mu$.

2. Este facto permite a determinação destes conservantes, derivados do ácido para-hidroxibenzóico, por espectrofotometria diferencial da solução alcalina e ácida na zona de 296-297 $m\mu$, nos preparados galénicos em que a mistura dos outros componentes apresenta um isobéstrico naquela zona.

3. Obtiveram-se resultados satisfatórios com este método, que é bastante rápido e suficientemente preciso, num xarope de di-ter-butil-naftaleno-sulfonato de sódio, num injectável de petidina, numa solução injectável de semicarbazona do adrenocromo e ainda numa solução oral de vitaminas do complexo B com cloreto de lisina.

SUMMARY

It was proved that while in a ClH 0,1 N solution the methyl and propyl parabens U. V. spectra are quite similar to those obtained in alcoholic solution, the spectra of the same compounds in OHNa 0,01 N are clearly different, with displacement of the main maximum from 257-258 $m\mu$ to 295-297 $m\mu$.

This fact allows a differential spectrophotometry of the alkaline solution against the acid solution on the zone near to 296 $m\mu$, and by this way, to realize the quantitative determination of this preservatives in liquid galenic preparations where the spectra of the other components are practically coincidents in alkaline and acid solution.

The AA. present as examples the dosage of the parabens in an oral solution of lysine and B complex vitamins, in parenteral preparations of semicarbazone of adrenochrome and pethidine, and on a syrup of di-ter-butyl-naphalene sodium sulphate.

This method could not be used on an oral solution of oxedrine tartrate, on the adrenaline hydrochloride solution and on the injection of the B₁ vitamine.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) INTONTI, R. e colab.: *Boll. lab. chim. provinciali*, **11**, 147 (1960).
(²) TRIFRIO, E.: *Ind. Conserve*, 279 (1960).
(³) CAZINELLI, J. L. e SINCHNER, J. E.: *J. Pharm. Sci.*, **51**, 336 (1962).

NOTA SOBRE A PREPARAÇÃO DO INJECTÁVEL DE BICARBONATO DE SÓDIO

MARIA ADÉLIA BAPTISTA FERNANDES

MARIA LAURA MAYMONE MARTINS

Licenciadas em Farmácia

É corrente o uso de soluções injectáveis de bicarbonato de sódio, especialmente em casos de acidose grave, soluções cuja concentração e processos de esterilização variam segundo os autores e para as diferentes farmacopeias. Assim, por exemplo, a Farmacopeia Portuguesa (1) preconiza a solução a 8%, esterilizada no autoclave a 110° por 15 minutos; a Farmacopeia Francesa (2) o soluto a 1,4%, tinalizado a 70°; CERDÁ e IGLÉSIAS, no seu livro sobre teoria e prática de injectáveis (3) referem concentrações de 0,5% a 5%, tinalizando a 70° as soluções; e a Farmacopeia Britânica (4) manda fornecer o injectável a 5% quando não haja indicação especial, esterilizando-o por aquecimento no autoclave ou por filtração.

No Hospital de Santa Maria utilizam-se o injectável de bicarbonato de sódio isotónico — a 1,7%, em frascos de 1 litro, esterilizados por aquecimento a 100° durante 30 minutos — e ainda o injectável a 6% em ampolas brancas de 10 cm³. Neste último, quando esterilizado a temperatura superior a 60°-70°, verificava-se frequentemente a formação de um precipitado que, segundo alguns autores, seria de carbonato de cálcio originado pela cedência de iões Ca⁺⁺ pela superfície interna das paredes das ampolas.

O facto da formação de tal precipitado, além de conferir ao injectável aspecto desagradável do ponto de vista galénico, pode constituir perigo visto que o produto se destina a injeção intravenosa.

No intuito de evitar os inconvenientes apontados, e baseando-nos num artigo inserido na revista romena «Farmácia» (5) versando precisamente sobre «Estabilização de soluções injectáveis contendo iões CO₃ = e CO₂H — iniciámos a preparação da solução de bicarbonato de sódio a 6% adicionada de sal dissódico do EDTA na concentração de 0,20%. O emprego desta substância deve-se às suas propriedades complexantes, bloqueando competitivamente os iões Ca⁺⁺ cedidos pelo vidro, e à supremacia que apresenta, neste caso, sobre outros quelantes, pois além de ser solúvel, e de formar com o cálcio um complexo incolor, solúvel também e de K *instabilidade* baixa, é fácil de obter, económico, e tem sido utilizado na terapêutica até em concentrações elevadas.

Tendo em vista confirmar a vantagem da utilização do edetato de sódio como estabilizante da solução injectável de bicarbonato de sódio, e ainda estudar a possibilidade de utilizar uma técnica de esterilização mais segura, preparámos vários lotes sempre com a mesma técnica básica (dissolução do bicarbonato em água para injectáveis, passagem duma corrente de anidrido carbónico através do soluto até neutralização à fenoltaleína (6), filtração, e enchimento das ampolas também com anidrido carbónico) fazendo variar os três factores que supomos responsáveis pelos resultados observados:

- pureza da droga (pura ou pró-análise)
- associação ou não de complexante, e
- processo de esterilização (tinalização a 60°-70°, aquecimento a 100° por 30 minutos ou a 115°-118° por 25 minutos).

Constatámos ser de importância fundamental o estado de pureza do bicarbonato, não se chegando até a verificar qualquer melhoria do resultado nas associações de quelante com droga que não seja do tipo pró-análise. Obtivemos sim mais êxito nos lotes em que houve emprego simultâneo de bicarbonato p.a. e complexante.

No que respeita à temperatura de esterilização, não notamos qualquer desvantagem na utilização da temperatura mais elevada (115°-118° por 25 minutos) tendo, pelo contrário, obtido o melhor resultado no lote esterilizado a esta temperatura, que continha, como dissemos, bicarbonato pró-análise e sal dissódico de EDTA.

É ainda importante notar que o pH, após esterilização, é idêntico para qualquer das temperaturas utilizadas.

No artigo da revista romena já atrás referido, o autor aconselha ainda efectuar a filtração do soluto a temperatura entre + 2° e + 4° C, e, para ainda maior eficiência, preconiza tratamento dos recipientes de vidro por uma solução a 12% de fosfato dissódico em amónia a 5%, ou por um soluto de EDTA a 1%.

Contudo, o nosso trabalho orientou-se de modo a verificar a possibilidade de obtenção dum soluto em boas condições que não exigisse pormenores de técnica pouco acessíveis numa produção rotineira de grande escala.

Embora o tempo em que foi feito este estudo seja ainda insuficiente para nos dar uma ideia segura da estabilidade das soluções preparadas pelas diferentes técnicas e da vantagem do uso do edetato de sódio, um lote preparado por este método há cerca de 8 meses apresenta-se ainda perfeitamente límpido.

Em conclusão dos nossos ensaios, pareceu-nos que a técnica proposta pelos autores romanos (adição de 0,020 % de sal dissódico de EDTA) será de aconselhar como rotina na preparação dos injectáveis de bicarbonato de sódio a 6%, que deste modo poderão ser esterilizados por autoclavação a 115°-118° por 25 minutos.

SUMMARY

Brief remark about a preparation technique of the sodium bicarbonate parenteral preparations at 6%. Technique that allows to obtain limpid solutions without the forming of the thin dust that sometimes can be observed in the blisters immediately after the sterilization or during the storage.

Centro de Documentação Farmacêutica

BIBLIOGRAFIA

- da Ordem dos Farmacêuticos
- (¹) Farmacopeia Portuguesa IV, 498 (1946).
 - (²) Pharmacopée Française, 7.^e edition, 675 (1949).
 - (³) CERDÁ e IGLÉSIAS: «Medicamentos injectables teoria e prática de su preparación», 2.^a edição, 234 (1944).
 - (⁴) The British Pharmacopoeia, (Ed. 1953 e 1958).
 - (⁵) MOLDOVAN, A.: *Farmácia*, 10, 641 (1964).

(Trabalho realizado nos Serviços Farmacêuticos do H. S. M.)

ESTUDO DE UM MÉTODO FARMACODINAMICO PARA O ENSAIO DE MASSAS PARA SUPOSITÓRIOS

MARIA JOSÉ RADELET
Licenciada em Farmácia

ANTÓNIO COSTA
1.º Assistente da Faculdade de Farmácia do Porto
Bolseiro da I. A. C.

CEMELI, BOUCARD e BEAULATON (1) elaboraram uma técnica para estudar a absorção por via rectal, em função do excipiente, inspirando-se no método descrito por VALLETTE e CAVIER (2) para o estudo da absorção cutânea.

Dada a diversidade de técnicas propostas e as opiniões controversas sobre as mesmas propuzeram-se os autores do presente trabalho estudar o interesse prático do método acima citado.

O princípio do método proposto por CEMELI e colaboradores consiste em preparar supositórios de prostigmina, com diversos excipientes, administrá-los a cobaias e medir a rapidez e intensidade de absorção pelo test gastrocnémio ciático.

Seguimos a técnica indicada por aqueles autores com ligeiras modificações que a prática aconselhou.

PARTE EXPERIMENTAL

Os ensaios foram feitos com cobaias com o peso médio de 550 g.

Anestesiaram-se os animais por administração intraperitoneal de um soluto de uretano a 10% na dose de 1,2 g/Kg, dose que para alguns se revelou insuficiente pelo que houve que aumentá-la.

O animal, uma vez anestesiado é fixado, em decúbito ventral, numa placa aquecida porque a anestesia determina em regra uma hipotermia no animal de experiência razão porque há conveniência em o aquecer durante o tempo que dura o ensaio.

Faz-se uma incisão na pele da coxa seguindo a depressão entre os músculos bíceps, depressão que segue aproximadamente uma linha que vai do grande trocânter à crista poplíteia.

Separam-se os músculos com uma sonda canelada (não há necessidade de empregar agulhas de vidro) e profundamente, quase junto ao fémur, encontra-se o grande ciático. Aconselha-se fazer a incisão na parte superior da coxa porque, mais ou menos a meio, o ciático bifurca-se. Aplica-se ao nervo um excitador ligado a um estimulador electrónico (é inútil adaptar-lhe uma cápsula de plástico com talco e soro fisiológico para evitar que seque pois um simples algodão embebido em soro basta).

Descobre-se em seguida a extremidade do gastrocnémio que se corta e, por meio de um fio, se liga a uma alavanca inscriptora.

Aplicam-se ao ciático estímulos eléctricos com a frequência de 3 por minuto, frequência aconselhada por CEMELI e também o mínimo dado pelo nosso aparelho. A intensidade do estímulo é graduada de modo a obterem-se contracções supra-máximas e anda à volta de 5-7 volts.

As contracções do músculo registam-se num cilindro de rotação lenta, obtendo-se um miograma de aspecto rectangular limitado na parte superior por uma linha levemente denteada.

Quando as respostas tomam um aspecto regular introduz-se o supositório registando-se as contracções durante 90 minutos. Desde que a intensidade e a frequência sejam bem reguladas não há perigo de aparecimento de fadiga muscular nesse lapso de tempo, conforme foi relatado por BINET e BARGETON (2).

Quando a prostigmina começa a ser absorvida há um aumento das contracções que atinge um máximo o qual, conforme as bases, diminui progressivamente ou se mantém em «plafond» algum tempo para depois diminuir. Nunca porém a amplitude da contracção volta a atingir o valor inicial.

Para avaliar as características de uma massa, sob o ponto de vista da rapidez de absorção há, segundo VALLETE, dois períodos a considerar:

1.º Tempo de latência: o tempo que medeia entre o momento de administração do supositório e o aparecimento do efeito.

2.º Tempo de efeito máximo: o tempo que vai desde a introdução do supositório ao momento do efeito máximo.

Para a introdução do supositório não convém suspender os estímulos porque verificámos que ao reiniciar a estimulação a amplitude das contracções se tornava maior. Como é praticamente impossível introduzir o supositório sem deslocar, ainda que ligeiramente, o animal, desligámos o inscriptor. É por isso que nos nossos gráficos aparece uma solução de continuidade.

Os animais foram mantidos em jejum 48 horas (24 horas revelaram-se insuficientes pela presença de fezes que além de provocarem a expulsão do supositório falseiam o tempo de absorção).

Para evitar a expulsão do supositório aplica-se uma pinça no recto.

Os excipientes empregados foram os seguintes:

Lipossolúveis:

Manteiga de cacau
Monoestarinó BB
Dehidag 33/35
Dehidag 35/37

Hidrossolúveis:

Base 1: Carbowax 4.000 — 33%
Carbowax 6.000 — 47%
Água — 20%

Base 2: Carbowax 1.500 — 33%
Carbowax 6.000 — 47%
Água — 20%

O peso do supositório foi calculado na base de 16 mg de prostigmina por Kg de animal.

Esta dose parecerá exagerada mas a verdade é que com a dose de 8 mg/Kg (aconselhada por CEMELI) houve muitos cobaios que não reagiram. Mesmo na dose de 16 mg/Kg há animais que não reagem embora em percentagem muito menor.

Esta dose permitiu-nos também, pelas manifestações secundárias que provocara (salivação abundante, dacriorreia, miocolonias) assegurar-nos que a substância activa tinha sido absorvida pois elas apareciam mesmo em animais que não reagiam gráficamente. É interessante notar que as miocolonias principiam na cabeça, propagam-se depois ao corpo e em geral só tardiamente atingem o gastrocnémio sendo visíveis nos gráficos sob a forma de contracções secundárias, na linha de base.

Dada a grande desproporção entre o excipiente e a substância activa resolvemos empregar esta sob a forma de soluto. Embora seja sabido que a velocidade de absorção depende também da substância estar ou não dissolvida, pareceu-nos que para o fim que tínhamos em vista — estudar o interesse prático do método e comparar as massas umas em relação às outras — isso não teria importância e facilitava-nos o trabalho.

Não sabemos se CEMELI empregou a prostigmina sob a forma de pó — a ser assim isso explicaria o facto dos valores por nós achados serem algo diferentes.

Para os excipientes lipossolúveis empregamos como agente emulsivo a cera em proporção tal que não alterou o ponto de fusão.

Eis os resultados médios obtidos com as diferentes massas:

Massas	Tempo de latência	Tempo de efeito máximo
Manteiga de cacau	7 m	34 m
Monoestarinum BB	6 m	33 m
Dehidag 33/35	5,6 m	36,6 m
Dehidag 35/37	18,5 m	55,5 m
Base 1	14 m	54,5 m
Base 2	19 m	43 m

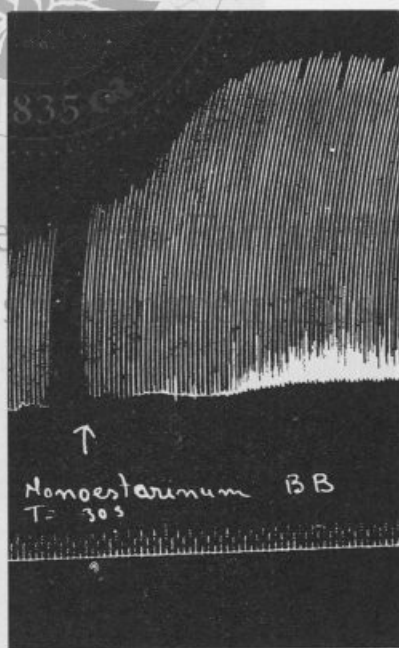
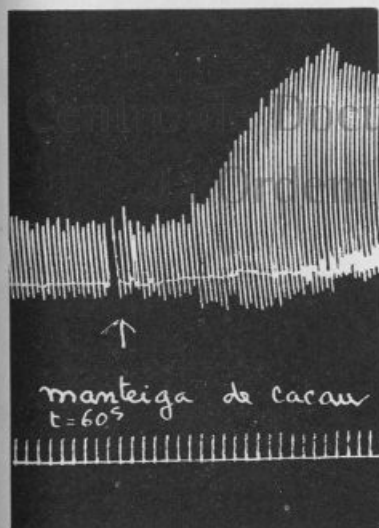


Fig. 1

Fig. 2

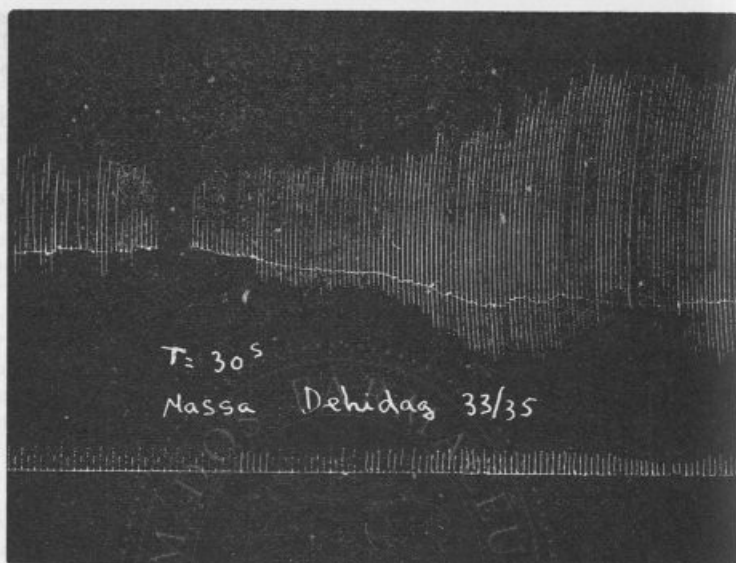


Fig. 3

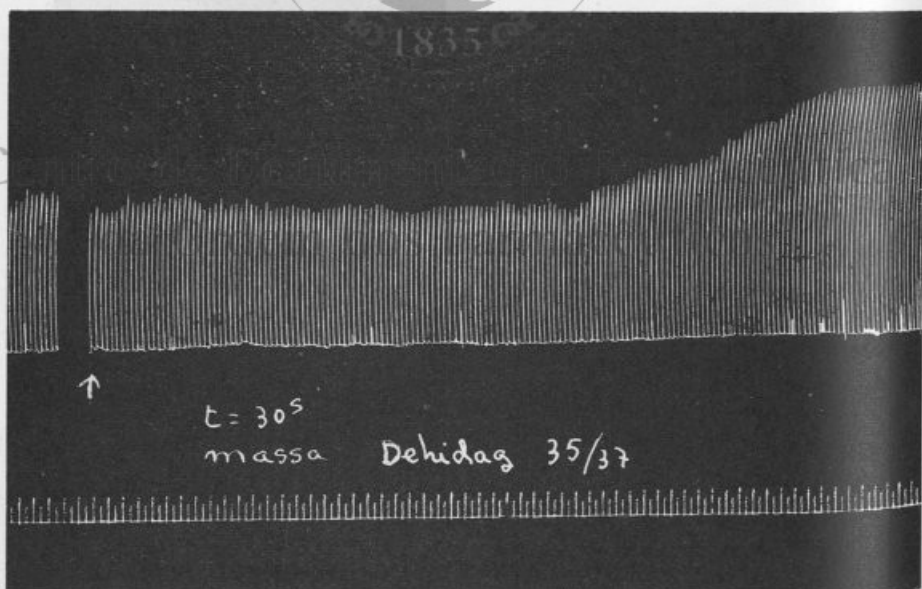


Fig. 4

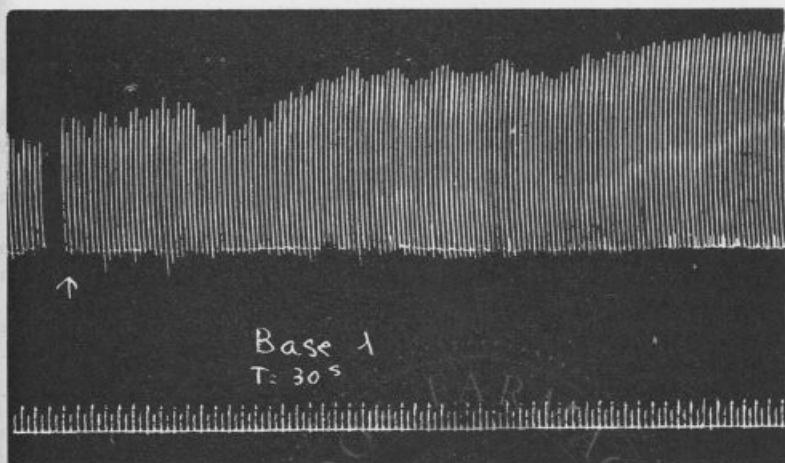


Fig. 6

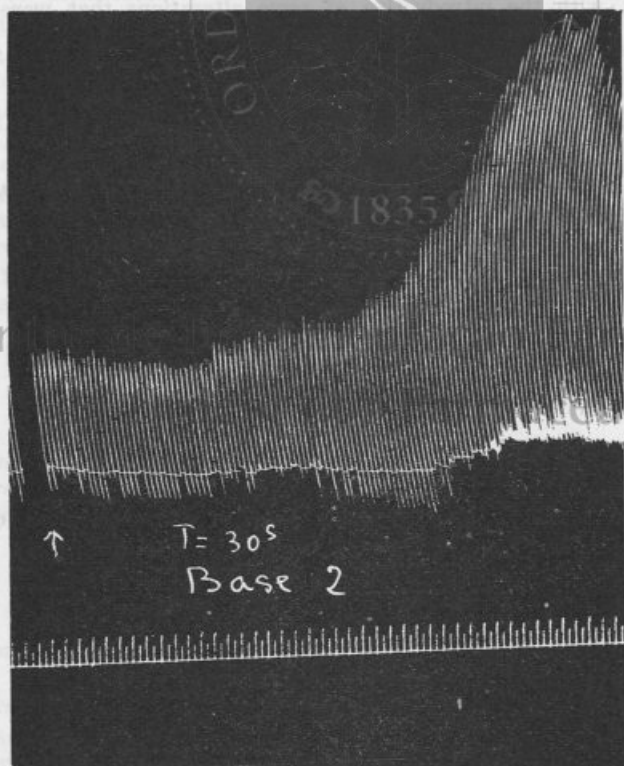


Fig. 6

CONCLUSÕES

O número de ensaios feitos, embora grande, não permite tirar conclusões absolutamente seguras. Parece-nos porém que podemos admitir o seguinte:

1.º — O método em questão tem interesse prático sobretudo para substâncias com características idênticas às da prostigmina sobretudo no que diz respeito à solubilidade.

Tendo em vista as características da substância activa este método permitiria escolher o excipiente conforme a conveniência da absorção.

2.º — A massa que mais interessante se revelou sob o ponto de vista da absorção foi o Monoestarino BB seguido da Dehidag 33/35 (a de mais baixo ponto de fusão) e da manteiga de cacau.

3.º — Confirma-se o que tem sido relatado, que as bases lipossolúveis dão melhor absorção que as hidrossolúveis.

SUMMARY

The present work was accomplished with the purpose of verifying experimentally the method proposed by J. Cemeli, Beaulaton and Boucart in *Galenica Acta*, IX year, I and II Fasc., 1956, for the study of the variation of the rectal via absorption according to the excipient's nature.

Using prostigmine suppositories and following the referred technique by these authors, with the introduction of some alterations that were advised by the practice.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CEMILE, BOUCARD e BEULATON — *Galenica Acta*, 9, fasc. I e II (1956).
- (²) VALLETE e CAVIER — *C. R. Soc. Biol.* 144, 825 (1950).
- (³) BINET e BARGETON — *J. de Physiologie*, 43, 41 (1951) e *J. Phys. Plat. Gen.*, 38, 26 (1941-43).

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

(Trabalho realizado no Centro de Estudos Farmacológicos do Instituto de Alta Cultura).

SOBRE MERCAPTANOS NAS AGUARDENTES VÍNICAS

LOURDES GUEDES GOMES

Licenciada em Farmácia

As necessidades tecnológicas, numa exigência e apuro constantes, levaram a investigação a aprofundar as suas pesquisas analíticas. Os dados químicos que há poucos anos bastavam aos técnicos para cumprir a sua missão, apresentam-se hoje insatisfatórios.

Há que recorrer a novos processos, e a aparelhos construídos sob princípios originais recentes, para que qualitativa e quantitativamente surjam compostos cuja presença era desconhecida.

Entramos decididamente na fase da microquímica bromatológica.

As aguardentes suportam também esta incidência.

Aos esterres, aldeídos, alcoois superiores, e alguns outros compostos, vieram-se somar os mercaptanos.

Reputa-se de interesse averiguar das características organolépticas das aguardentes em presença dos seus compostos sulfurados mais representativos: ácido sulfídrico, anidrido sulfuroso e mercaptanos.

BRENNER e colaboradores (1), assim como KLEBER (2) OBATA e YAMANASHI (3), CH. A. MASSCHELEIN, CL. RAMOS JEUNEHOMME e A. DEVREUX (4), iniciaram uns e deram outros seguimento ao estudo destes compostos.

Do trabalho já realizado, e em continuação no Instituto do Vinho do Porto, extractamos alguns números e considerandos sobre os mercaptanos.

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

PARTE EXPERIMENTAL

O método que se aplicou às aguardentes baseia-se naquele que Brenner e colaboradores empregaram para as cervejas: o enxofre coloidal reagindo sobre os mercaptanos origina um dissulfureto e ácido sulfídrico conforme a equação

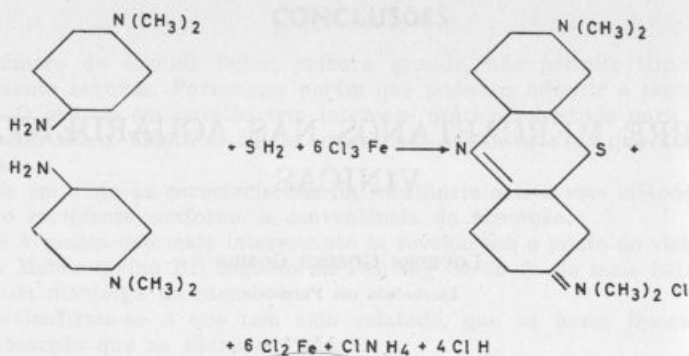


Duas moléculas de mercaptano correspondem à formação de uma de ácido sulfídrico.

A reacção processa-se a um pH=7 e a uma temperatura de 30° C..

O arrastamento do H₂ S faz-se por uma corrente de CO₂ ou de N.

O H₂ S é recebido numa solução de acetato de zinco e valorizado colorimêtricamente após a sua transformação em azul de metileno pela reacção com o p-aminodimetilanilina e o cloreto férrico.



O valor da absorção espectrofotométrica determina-se a 745 m μ . (Fig. 1).
 O método quando aplicado a cervejas, exige uma destilação prévia para separar os mercaptanos. Como a aguardente é já um produto destilado, tentamos aplicar o método suprimindo essa operação.

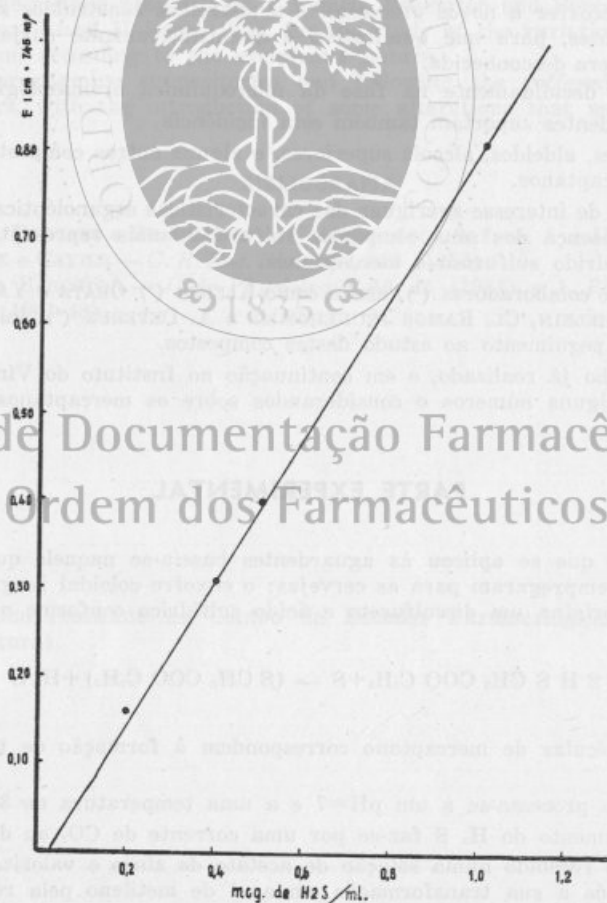


Fig. 1

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

É indispensável efectuar um ensaio em branco e, no caso de haver H_2S livre, determiná-lo em ensaio individual para ser descontado no H_2S total.

Tendo sido verificado que a presença de certos catiões, nomeadamente o cobre, que existe em diminutas quantidades nas aguardentes, impedia o arrastamento do sulfídrico, houve necessidade de os complexar pela adição da orto-fenantrolina e do titriplex. Pode-se também destilar previamente a aguardente, para obviar a esse inconveniente.

Outra técnica que se tentou aplicar às aguardentes foi a de SLIVINSKI e DOTY (*) que se baseia na formação dum complexo vermelho, pela reacção entre o mercaptano e o dimetil-p-fenilnadiamina.

Os mercaptanos voláteis são arrastados por meio de uma corrente de azoto e a uma temperatura conveniente, entre os 60 e 75° C., e recebidos numa solução de fixação de acetato mercúrico.

O mercaptideo formado, em presença do reagente já mencionado, origina um complexo vermelho cujo valor de absorção é medido em espectrofotómetro a 500 m μ .

O tubo de recepção é um tubo de Folin-Wu rolhado, que se mantém em água com gelo de forma a conservar numa temperatura entre 0 e 4° C. O tubo de saída do gás termina numa ponta capilar que se destaca e se introduz no tubo de Folin-Wu, onde permanece enquanto se dá o desenvolvimento da cor, visto interiormente apresentar um precipitado aderente de mercaptideo de mercúrio.

O teor de mercaptanos é determinado por meio duma curva padrão, empregando soluções contendo quantidades conhecidas de mercaptanos.

No nosso trabalho empregaram-se como padrões os seguintes mercaptanos voláteis: etilmercaptano, isopropilmercaptano e n-butilmercaptano.

Os autores, em relação ao metilmercaptano, indicam o método como quantitativo para concentrações de 5 a 110 mcg.

Partindo deste critério preparamos soluções padrões e construíram-se os gráficos (Fig. 2).

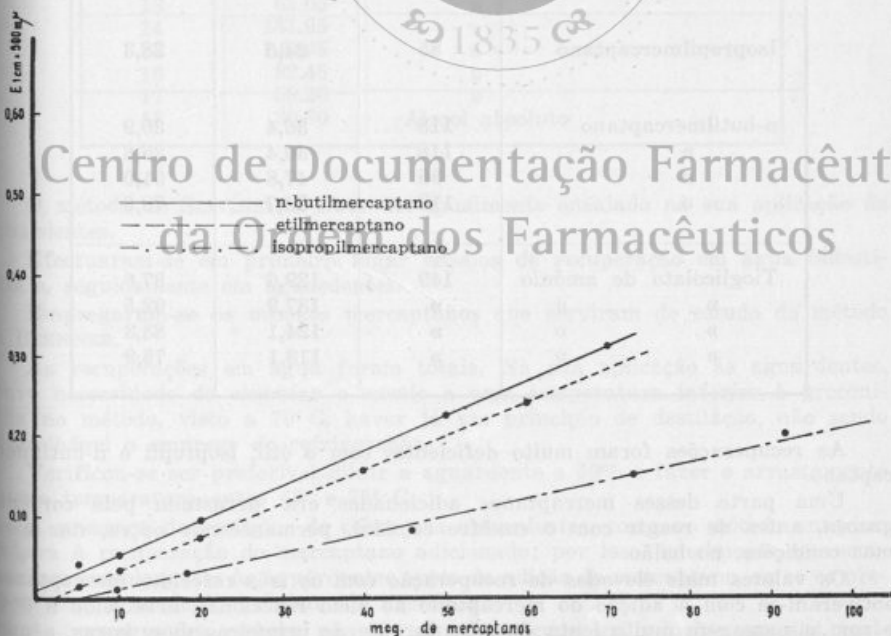


Fig. 2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

BRENNER e colaboradores efectuaram verificações do método unicamente em relação ao mercaptoacetato de etilo, composto este que se formaria nas cervejas, segundo OBATA e YAMANASHI, por redução fotoquímica do dissulfureto correspondente, e que lhes imprime um gosto característico.

No nosso estudo empregou-se o tioglicolato de amónio, para ensaios de recuperação. Os resultados obtidos oscilaram entre 78,6 e 92,5 %, com a adição de 149 mcg do mercaptano.

Tentou-se verificar a eficiência do método quando aplicado a outros mercaptanos voláteis.

Assim, ensaiaram-se os seguintes compostos: etilmercaptano, isopropilmercaptano e o n-butilmercaptano.

No quadro I estão coligidos alguns resultados.

QUADRO I
Recuperações de mercaptanos adicionados a aguardentes
Método de Brenner

	Adicionado mcg	Recuperado mcg	Recuperação %
Etilmercaptano	72	28,4	39,4
»	72	58,7	81,6
»	90	53,1	59,0
Isopropilmercaptano	85	24,5	28,3
n-butilmercaptano	118	36,4	30,9
»	118	30,4	25,8
»	95	47,8	51,0
»	118	92,7	78,6
Tioglicolato de amónio	149	129,6	87,0
»	»	137,9	92,5
»	»	124,1	83,3
»	»	113,1	75,9

As recuperações foram muito deficientes com o étil, isopropil e n-butilmercaptano.

Uma parte desses mercaptanos adicionados era arrastada pela corrente gasosa, antes de reagir com o enxôfre coloidal, permanecendo outra, nas mesmas condições, no balão.

Os valores mais elevados de recuperação com os três referidos mercaptanos, obtiveram-se com a adição do mercaptano ao meio reaccional, arrefecido a 0° C. e com a passagem muito lenta do gás, durante as primeiras duas horas, e num pouco mais rápida em duas horas seguintes.

Com o Tioglicolato de amónio (mercaptoacetato de amónio), as recuperações apresentaram-se mais satisfatórias.

Pelo método de BRENNER, obtêm-se indistintamente valores de mercaptanos pelo que se exprimiram em sulfidrílo.

Na aplicação desse método a algumas aguardentes existentes no Laboratório, encontrámos resultados que vão de 14,54 a 588,62 mcg%, expressos em — SH, conforme se pode ver no quadro II.

QUADRO II

Mercaptanos em aguardentes

Número de ordem	em (-SH) mcg %/oo	Produtos ensaiados
1	14.54	Aguardente de água-pé de 50°
2	14.54	» » » »
3	24.24	» » » » 60°
4	97.00	» » » » 70°
5	358.90	» » » » 77°
6	295.84	» » » » 80°
7	83.10	Aguardente
8	82.44	»
9	588.62	»
10	151.34	»
11	63.05	»
12	38.80	»
13	63.05	»
14	131.95	»
15	140.65	»
16	82.45	»
17	58.20	»
18	20.60	Alcool absoluto

O método de SLIVINSK e DOTY foi igualmente ensaiado na sua aplicação às aguardentes.

Efectuaram-se em primeiro lugar ensaios de recuperação em água bidestilada e, seguidamente em aguardentes.

Empregaram-se os mesmos mercaptanos que serviram de estudo do método de BRENNER.

As recuperações em água foram totais. Na sua aplicação às aguardentes, houve necessidade de executar o ensaio a uma temperatura inferior à preconizada no método, visto a 70° C. haver já um princípio de destilação, não sendo aconselhável o emprego de refrigeração.

Verificou-se ser preferível diluir a aguardente a 50% e fazer o arrastamento a uma temperatura entre 65° e 75° C.

A presença de vestígios de cobre nas aguardentes, como no método anterior, obstava à recuperação do mercaptano adicionado; por isso, igualmente se incorporaram complexantes às aguardentes antes da adição do mercaptano, ou se empregava uma aguardente previamente destilada.

As recuperações, embora não tão completas como em soluções aquosas, oscilavam entre os 90 e 95%, conforme o quadro III.

QUADRO III

Ensaio de recuperação de mercaptanos

	em OH ₂ bidestilada			em aguardente destilada		
	Adicio- nado mcg	Recupe- rado mcg	Recupe- ração %	Adicio- nado mcg	Recupe- rado mcg	Recupe- ração %
Etilmercaptano	80	80	100,0	77	70	90,9
»	40	40	100,0	77	72	93,5
»				80	75	93,6
»				92	92	100,0
Iso-propilmercaptano	91	87	95,6	91	87	95,6
n-butylmercaptano	92	88	95,6	88	81	91,4

Ensaio efectuado por este método, com o tioglicolato de amónio, foram negativos, embora a reacção de formação do complexo vermelho se desenvolva com normalidade quando feita directamente.

Com a aplicação deste método às aguardentes, os resultados não foram concludentes.

Tentou-se fazer uma aplicação directa do método, sem arrastamento pelo azoto.

Obteve-se a cor vermelha característica, mas que por interferência de outros compostos desaparecia ao fim de poucos minutos, dando lugar a uma cor acastanhada.

Contudo, com a adição de 46 mcg de n-butylmercaptano respectivamente a 10,5 e 2 ml de aguardente obtiveram-se recuperações aceitáveis.

Como se disse, este estudo ainda continua, numa tentativa de dilucidar este e outros problemas que nos surgiram.

CONCLUSÕES

Do trabalho efectuado até este momento foi possível verificar a presença nas aguardentes de mercaptanos, doseáveis pelo método de BRENNER.

da Ordem dos Farmacêuticos

SUMMARY

Of the sulphurated compounds whose presence, even in the lowest quantities, may confer the most peculiar organoleptic characteristics to brandies or detach de sulphurous anhydride, hidrosulphuric acid and mercaptans.

By now, we are concerned on the methods applicable to brandies, who allow the mercaptans microdetermination.

There were studied two colorimetric methods.

One of this methods, applied to beer by Brenner and cols, is based upon the colloidal sulphur reaction with the mercaptans, who leads to the forming of hidrosulphuric acid that is dragged by a CO₂ or N current and received on a zinc acetate solution where is transformed in methylene bleu by reacting with p-aminodimethylaniline and ferric chloride.

The absorption value is determined by the spectrophotometer at 745 mμ.

The other studied method was the Slivinski and Doty's one, who is based upon the forming of a red complex, by the reaction between the mercaptans,

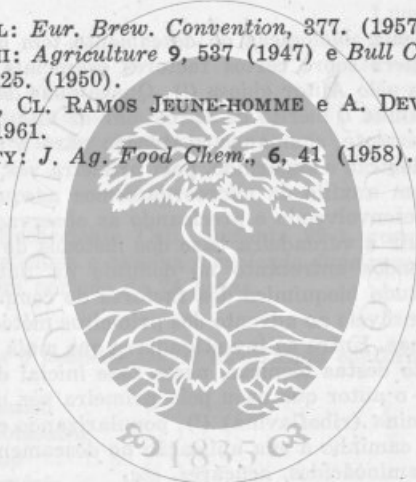
dimethyl-p-phenilene-diamine and ferric chloride. The absorption value of the red complex is determined by the spectrophotometer at 500 m μ .

There were performed verification assays for the methods relating to ethyl-mercaptan, isopropilmercaptan, n-butylmercaptan and ammonium tioglicolate.

In the employ of the Brenner's method to some brandies there were obtained results ranging from 14,58 to 588,62 mcg % expressed in SH.

BIBLIOGRAFIA

- (1) M. W. BRENNER, J. L. OWADES e R. GOLYZNIAC: *Am. Soc. Brewing Chemists* 83 (1953), 81 (1954).
 M. W. BRENNER, J. L. OWADES e FAZIO: *Am. Soc. Brewing Chemists* 125, 133 (1955).
- (2) W. KLEBER e J. LAMPL: *Eur. Brew. Convention*, 377. (1957).
- (3) OBATA e T. YAMANASHI: *Agriculture* 9, 537 (1947) e *Bull Chem. Soc. Japan*, 22, 247 (1949) e 23, 125. (1950).
- (4) CH. A. MASSCHHELEIN, CL. RAMOS JEUNE-HOMME e A. DEVREUX: *European Brewery Convention*, 1961.
- (5) R. A. SLIVINSKI e DOTY: *J. Ag. Food Chem.*, 6, 41 (1958).



Centro de Documentação Farmacêutica
 (Trabalho efectuado no Instituto do Vinho do Porto)
 da Ordem dos Farmacêuticos

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO DO PANTOTENATO DE CÁLCIO, ÁCIDO FÓLICO E INOSITOL EM MEDICAMENTOS COMPLEXOS

GERARDO MATTA
Licenciado em Farmácia

A. G. NOGUEIRA
Licenciada em Farmácia

As técnicas microbiológicas de doseamento tem origem nas pesquisas fundamentais de *Wildiers* sobre certos factores essenciais de crescimento das leveduras, denominadas pelo Autor «bios»⁽¹⁾. Quase duas décadas depois, por alturas de 1919, *WILLIAMS* tinha o mérito de aproximar as vitaminas hidrossolúveis daqueles factores de crescimento, chamando a atenção para a notável semelhança das suas propriedades biológicas e sugerindo, pela primeira vez, a possibilidade de as dosear ou identificar com auxílio de microorganismos adequados. Mais tarde, os trabalhos de *LWOFF*, desenvolvendo e precisando as observações daqueles investigadores, viriam a constituir a verdadeira base dos métodos de titulação microbiológica. Os progressos realizados entretanto no domínio da nutrição animal e bacteriana, em especial o estudo bioquímico dos factores do complexo B, permitiram criar as condições indispensáveis ao advento dos primeiros métodos microbiológicos de doseamento de vitaminas. Entre os investigadores que mais contribuíram para a difusão e aperfeiçoamento destas técnicas, nesta fase inicial do seu desenvolvimento, deve citar-se *SNELL* — o autor que usou pela primeira vez uma bactéria láctica na titulação duma vitamina (riboflavina)⁽²⁾, popularizando este tipo da técnica e abrindo verdadeiramente caminho à sua aplicação no doseamento de muitos outros factores do complexo B, aminoácidos, açúcares, etc.

Como se sabe, o princípio destas técnicas de doseamento é simples: escolhida uma estirpe dum microorganismo cujo desenvolvimento exija especificamente a presença da vitamina a dosear semeia-se aquele em meio de cultura adequado e avalia-se o seu crescimento em relação a diversas diluições do referido factor de crescimento, introduzido no meio de cultura por técnica conveniente. Em condições de trabalho normalizadas observa-se proporcionalidade entre a intensidade de desenvolvimento bacteriano e a concentração do factor de crescimento a dosear. Todavia, tal proporcionalidade só é válida numa zona limitada de concentração do factor de crescimento, o que exige a investigação prévia das diluições de trabalho mais convenientes.

A importância dos métodos microbiológicos na pesquisa e no doseamento de substâncias naturais de estrutura química ainda mal definida, assume como se sabe um valor único, pois permite reconhecer novos factores e seguir a sua extracção ou purificação de complexos naturais diversos. É bem conhecido, por exemplo, o papel que desempenhou esta técnica na purificação e isolamento da vitamina B_{12} dos extractos de fígado. Por outro lado, em análise farmacéutica, particularmente no caso de preparações complexas, a utilidade destes métodos é também evidente, constituindo precioso auxílio na resolução de certos problemas analíticos em que as técnicas físicas ou os métodos químicos não são convenientes.

Apresentamos a seguir alguns casos típicos de doseamento microbiológico de vitamina^a (ác. fólico e ácido pantoténico) e dum açúcar (inositol) em preparações farmacéuticas complexas, cuja composição tornaria difícil ou pouco cómoda a aplicação doutras técnicas analíticas.

PARTE EXPERIMENTAL

1) TITULAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PANTOTENATO DE CÁLCIO

A técnica que estabelecemos baseia-se no método clássico convenientemente modificado, utilizando o meio de Davis como terreno de cultura (*) e tem-nos proporcionado excelentes resultados no doseamento do pantotenato de cálcio no BÉ-COMVITE C, um preparado polivitamínico com a seguinte composição:

Vitamina C	50 mg
Vitamina B ₁	5 mg
Vitamina B ₂	5 mg
Vitamina B ₄	1 mg
Vitamina B ₆	2 mg
Vitamina PP	25 mg
Pantotenato de cálcio	5 mg
Vitamina B ₁₂ cristalizada (activada pelo factor intrínseco)	5 microg
Excipientes	q.b.p. 1 drageia

Microorganismo-test: Escherichia Coli, mutante 99-1, conservado num meio gelosado, com extracto de levedura e caseína e repicado duas vezes por mês. A incubação é feita a 37°C por um período de 24 horas.

Meio basal: Utilizamos o meio de Davis modificado conforme segue:

fosfato dipotássico	7 g
fosfato monopotássico	3 g
citrato de sódio	0,5 g
sulfato de magnésio	0,1 g
sulfato de amónio	1 g
agar-agar	20 g
água destilada q.b.	1000 cc.

Esterilize a 115°-15'. pH=7

Esterilize à parte um soluto a 25% de glucose. Prepare, também à parte, um sol. de cloridrato de 2-3-5 trifeniltetrazol, com pH final de 2-3.

Material: Utilizamos como caixa de cultura uma placa rectangular (23^{cm} × 22^{cm}), em vidro Pyrex, de fundo perfeitamente plano e horizontal, munida de tampa de vidro. As soluções padrão e test introduzem-se no meio de cultura por intermédio de pequenos cilindros de porcelana apropriados.

Inóculo: Na véspera do ensaio passa-se uma ansa do microorganismo-test para 10 cc. de caldo comum. Incuba-se na estufa a 37° por 24 horas. No dia do ensaio centrifuga-se a cultura obtida e lava-se por três vezes com soro fisiológico. Torna-se a suspender o resíduo da centrifugação em cerca de 10 cc. de soro fisiológico. Homogeniza-se por pipetamento. Esta suspensão constitui o inóculo.

Solução test: A partir de uma amostra média de 10 comprimidos extrair com água destilada o pantotenato de cálcio e preparar diluições de modo a obter concentrações finais de 5 γ / cc e 0,5 γ / cc.

Solução-padrão: Partindo de um pantotenato de cálcio puríssimo preparar uma solução a 500 γ /cc. Desta solução, que é possível conservar na geleira por alguns meses, fazemos as diluições até às concentrações finais de 5 γ /cc e 0,5 γ /cc.

Técnica: Fundir 150 cc do meio de Davis e arrefecer a 40° em banho maria termostado. Juntar 2 cc do soluto de glucose e 1,5 cc do sol. de cloridrato de 2-3-5 trifeniltetrazol. Juntar o inóculo e misturar tudo muito bem. Verter na caixa de cultura. É absolutamente necessário que esta camada gelosada fique bem distribuída. Deixar solidificar a gelose.

Colocar os cilindros, previamente cheios com as soluções test e padrão, na superfície sólida do meio de cultura.

Tapar o tabuleiro com a respectiva tampa e colocá-lo na estufa a 37°, durante 18-24 h. Decorrido este tempo observar as zonas de crescimento, de cor vinosa, formadas à volta dos cilindros.

Cálculo: No intervalo considerado o diâmetro das zonas de crescimento é proporcional ao logaritmo da concentração, obtendo-se uma recta que traçamos em papel logaritmico, inscrevendo em ordenadas os diâmetros das zonas e em abscissas o logaritmo das concentrações 5 γ e 0,5 γ .

Sobre este gráfico, por simples interpolação, pode determinar-se a concentração da solução test.

A título exemplificativo reunimos no Quadro n.º 1 alguns dos resultados experimentais que temos registado no controle analítico das drageias Bêcomvite C. (Figs. 1, 2 e 3).

QUADRO N.º 1

Nome do produto		Diâmetros das zonas correspondentes às concentrações de 5 γ /cc.	Médias dos diâmetros	Diâmetros das zonas correspondentes às concentrações de 0,5 γ /cc.	Médias dos diâmetros	Porcentagem do pantotenato de cálcio	Gráficos
Bêcomvite C Lote 1514-3	Padrão	21-21-21,5- -21-21,5	21,2	11-12-11-11-11	11,2	98%	Fig. N.º 1
	Test	21,5-21,5-20,5- -21-21	21,1	10,5-11-12-11-11	11,1		
Bêcomvite C Lote 2052-3	Padrão	20-20-20-20	20	13-13-11-11	12	100%	Fig. N.º 2
	Test	20-20-20-20	20	12-12-12-12	12		
Bêcomvite C Lote 2096-4	Padrão	23,5-23,5- 23,5-23,5	23,5	12-12-12-12	12	110%	Fig. N.º 3
	Test	24-24-24-24	24	12,5-12,5- -12,5-12,5	12,5		

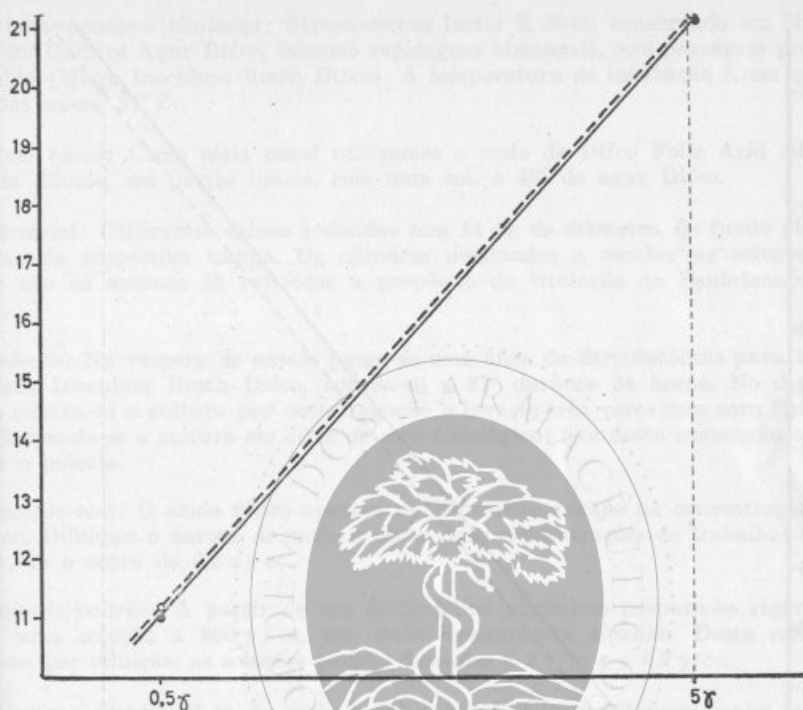


Fig. 1

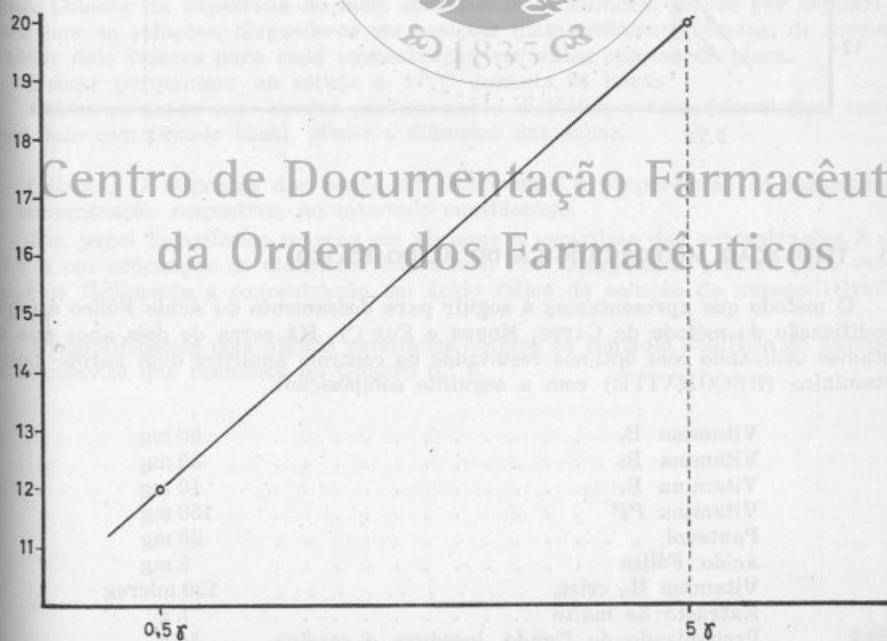


Fig. 2

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

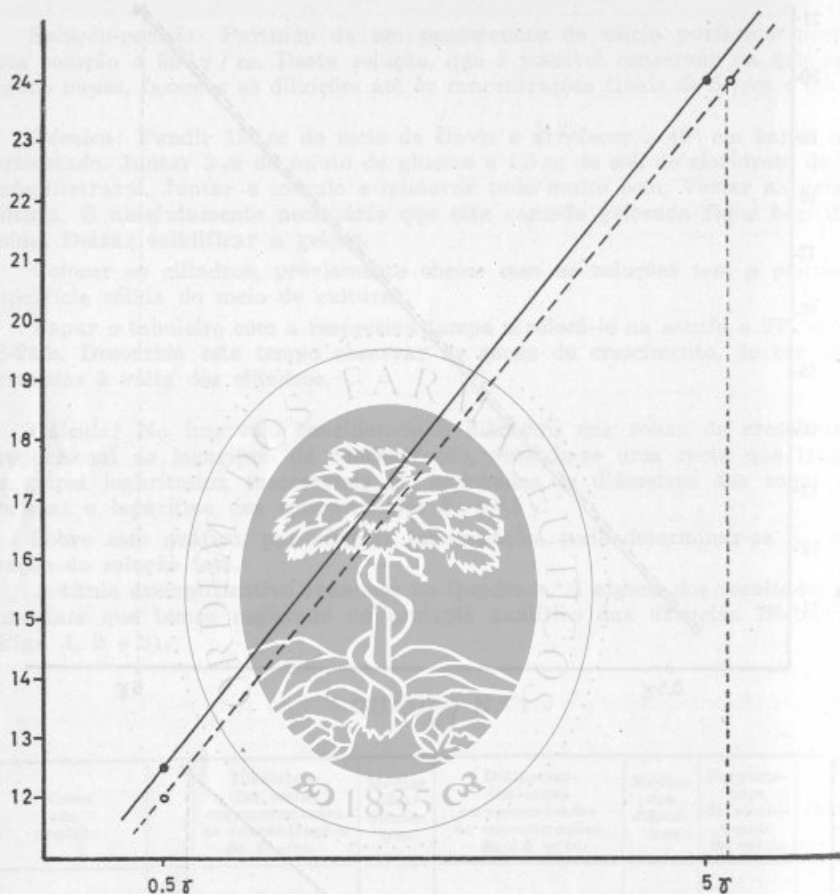


Fig. C

Centro de Documentação Farmacêutica

2) TITULAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO ÁCIDO FÓLICO

O método que apresentamos a seguir para doseamento do Ácido Fólico é uma modificação do método de CAPPS, HOBBS e FOX (*). Há cerca de dois anos que o estamos utilizando com óptimos resultados no controle analítico dum xarope polivitamínico (BÊCOMVITE) com a seguinte composição:

Vitamina B ₁	50 mg
Vitamina B ₂	30 mg
Vitamina B ₆	10 mg
Vitamina PP	150 mg
Pantenol	20 mg
Ácido Fólico	5 mg
Vitamina B ₁₂ crist.	120 microg
Extracto de malte	5 g
Proteolizado de fígado, levedura e caseína	30 g
Veículo xaroposo q.b.	100 cc.

Microorganismo titulador: *Streptococcus lactis* R 8043, conservado em Micro Inoculum Culture Agar Difco, fazendo repicagens bimensais, com passagem prévia por caldo (Micro Inoculum Broth Difco). A temperatura de incubação é, em qualquer dos casos, 37° C.

Meio basal: Como meio basal utilizamos o meio de Difco Folic Acid Assay Medium diluído, em partes iguais, com uma sol. a 4% de agar Difco.

Material: Utilizamos caixas redondas com 14 cm de diâmetro, de fundo plano, munidas da respectiva tampa. Os cilindros destinados a receber as soluções a dosear são os mesmos já referidos a propósito da titulação do Pantotenato de Cálcio.

Inóculo: Na véspera do ensaio passa-se uma ansa do *Streptococcus* para 10 cc de Micro Inoculum Broth Difco. Incubá-se a 37° durante 24 horas. No dia do ensaio separa-se a cultura por centrifugação e lava-se três vezes com soro fisiológico. Suspende-se a cultura em 10 cc de soro fisiológico; 5 cc desta suspensão constituem o inóculo.

Solução-test: O ácido fólico aparece no Bêcomvite xarope na concentração de 50 γ /cc. Diluimos o xarope de modo a obter duas concentrações de trabalho: uma de 2 γ /cc e outra de 0,2 γ /cc.

Solução-padrão: A partir de um ácido fólico puríssimo prepara-se rigorosamente uma solução a 200 γ /cc, em meio ligeiramente alcalino. Desta solução obtêm-se, por diluição, as soluções padrão doseadas a 2 γ /cc e a 0,2 γ /cc.

Técnica: Fundir 45 cc do meio basal e arrefecê-lo a 40° num banho maria termostatado. Juntar o inóculo. Misturar bem e verter na placa. Deixar solidificar. Colocar na superfície do meio solidificado os cilindros cheios por capilaridade com as soluções, dispondo-os em posições diametralmente opostas, de forma a obter dois valores para cada concentração, em sítios opostos da placa.

Deixar permanecer na estufa a 37° C durante 24 horas.

Obtêm-se zonas com bordos perfeitamente distintos e bem delimitados, contrastando com o meio basal. Medir o diâmetro das zonas.

Cálculo: O diâmetro das zonas de crescimento é proporcional ao logaritmo da concentração respectiva, no intervalo considerado.

Em papel logarítmico marcar em abcissas o logaritmo das concentrações 2 e 0,2 γ e em ordenadas os diâmetros das zonas. Por interpolação gráfica pode calcular-se facilmente a concentração em ácido fólico da solução do xarope (Graf. 4 e 5).

Exemplificamos com alguns resultados obtidos no controle analítico do xarope de Bêcomvite que reunimos no Quadro n.º 2.

QUADRO N.º 2

Nome do produto		Diâmetros correspondentes às concentrações das zonas de 0,2 γ	Médias dos diâmetros	Diâmetros correspondentes às concentrações das zonas de 0,2 γ	Médias dos diâmetros	Porcentagem de ácido fólico	Gráficos
Bêcomvite Xarope Lote 32457	Padrão	21-21	21	18-18	18	100%	Fig. N.º 4
	Test	21-21	21	18-18	18		
Bêcomvite Xarope Lote 32460	Padrão	21-21	21	18-18	18	100%	Fig. N.º 4
	Test	21-21	21	18-18	18		
Bêcomvite Xarope Lote 32487	Padrão	26-26	26	20-20	20	102,5%	Fig. N.º 5
	Test	26,2-26	26,1	20,2-20	20,1		

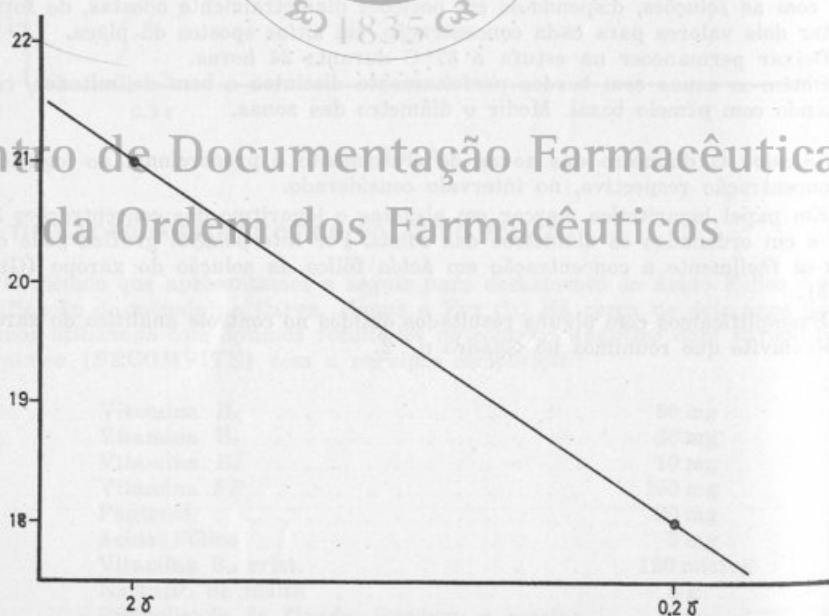


Fig. 4

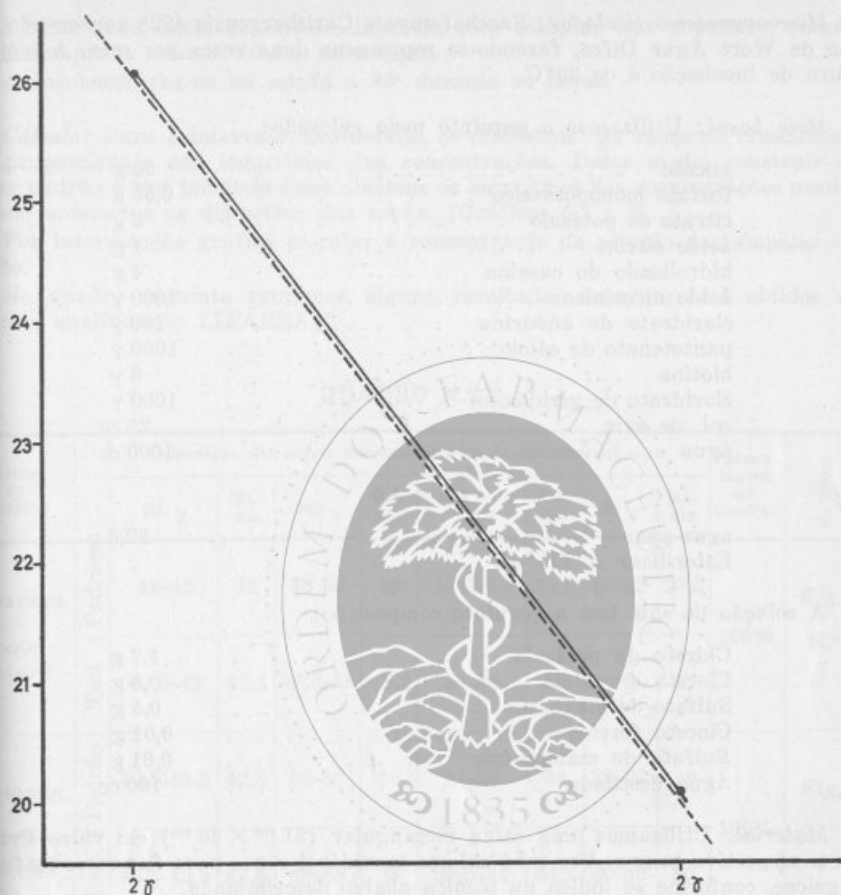


Fig. 5

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

3) TITULAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO INOSITOL

O método de doseamento que utilizamos na titulação do Inositol baseia-se no processo de A. JONES (5) que modificámos conforme se descreve a seguir. Este método tem-nos proporcionado excelentes resultados no controle do LIPARSAN, preparação farmacêutica que tem a seguinte composição:

Acetilmetioninato de colina	0,65 g
Inositol	0,50 g
Tiosulfato de sódio e magnésio	0,50 g
Vitamina PP	0,50 g
Veículo apropriado (levedura autolizada, sorbitol e suco de frutos) q.b.	10 cc.

Microorganismo titular: *Saccharomyces Carlsbergensis* 4228 conservado em meio de Wort Agar Difco, fazendo-se repicagens duas vezes por mês. A temperatura de incubação é de 30° C.

Meio basal: Utilizamos o seguinte meio gelosado:

glicose	50 g
fosfato monopotássico	0,55 g
citrato de potássio	5 g
ácido cítrico	1 g
hidrolisado de caseína	4 g
ácido nicotínico	1000 γ
cloridrato de aneurina	250 γ
pantotenato de cálcio	1000 γ
biotina	8 γ
cloridrato de piridoxina	1000 γ
sol. de sais	25 cc
água	1000 cc

agar-agar 22,5 g
 Esterilizar a 115°-15'

A solução de sais tem a seguinte composição:

Cloreto de potássio	1,7 g
Cloreto de cálcio	0,5 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Cloreto férrico	0,01 g
Sulfato de manganésio	0,01 g
Água destilada	100 cc.

Material: Utilizamos uma caixa rectangular (21 cm \times 30 cm) em vidro Pyrex, com a respectiva tampa. Um tubo em aço inoxidável serve para fazermos os furos na gelose, conforme se indica na técnica abaixo discriminada.

Inóculo: Tomar três anças de uma cultura de 24 horas. Fazer a suspensão em 10 cc de soro fisiológico. Centrifugar. Lavar por três vezes com soro fisiológico. Tornar a suspender em 10 cc. de soro fisiológico, obtendo assim o inóculo.

Solução-test: A partir de uma amostra média das ampolas fazer diluições de forma a obter quatro concentrações: 400 γ /cc., 200 γ /cc., 100 γ /cc. e 50 γ /cc.

Solução-padrão: Pesar rigorosamente 0,1 g de Inositol puro e dissolvê-lo em 100 cc de água destilada. A partir desta solução preparar com todo o rigor diluições a 400 γ /cc., 200 γ /cc., 100 γ /cc. e 50 γ /cc.

Técnica: Fundir 200 cc. do meio basal e arrefecê-lo em banho maria termos-tatado a 45° C. Adicionar o inóculo. Misturar cuidadosamente e verter na caixa rectangular. Deixar solidificar convenientemente. Com auxílio do pequeno tubo de aço inoxidável, funcionando como vasador, perfurar a gelose, retirando cilindros todos iguais e obtendo assim as cavidades que receberão depois as soluções. Em vez destas cavidades podemos usar também os cilindros já referidos nos outros doseamentos. Porém, preferimos as cavidades, pois as zonas aparecem muito mais nítidas e bem desenhadas.

Encher cada cavidade, alternadamente, com soluções test e padrão, empregando sempre o mesmo volume de solução.

A incubação faz-se na estufa a 30° durante 24 horas.

Cálculo: Para o intervalo considerado, os diâmetros das zonas de crescimento são proporcionais aos logaritmos das concentrações. Deste modo, construir as rectas padrão e test tomando como abscissas os logaritmos das concentrações usadas e como ordenadas os diâmetros das zonas. (Gráficos 6, 7 e 8).

Por interpolação gráfica calcular a concentração da solução das ampolas em estudo.

No quadro seguinte reunimos alguns resultados experimentais obtidos no controle analítico do LIPARSAN.

QUADRO N.º 3

Nome do produto		Diâmetros das zonas correspondentes às concentrações de							Porcentagem em Inositol	Gráficos	
		400 γ	Mé-dia	200 γ	Mé-dia	100 γ	Mé-dia	50 γ			Mé-dia
Liparsan Lote 4864/2	Padrão	42-42	42	38-38	38	33,5-34	33,8	30-29	29,5	105%	Fig. N.º 7
	Test	42,5-42	42,2	38,5-38	38,2	34-34	34	30-30	30		
Liparsan Lote 19 164/I	Padrão	42,5-42,5	42,5	38-38	38	34-34	34	30-30	30	100%	Fig. N.º 6
	Test	42,5-42,5	42,5	38-38	38	34,5-34	34,2	30-30	30		
Liparsan Lote 138 964	Padrão	44,5-44,5	44,5	39-39	39	33,8-33,8	33,8	28,5- -28,5	28,5	105%	Fig. N.º 8
	Test	45-45	45	40-40	40	34,4-34	34,2	29-29	29		

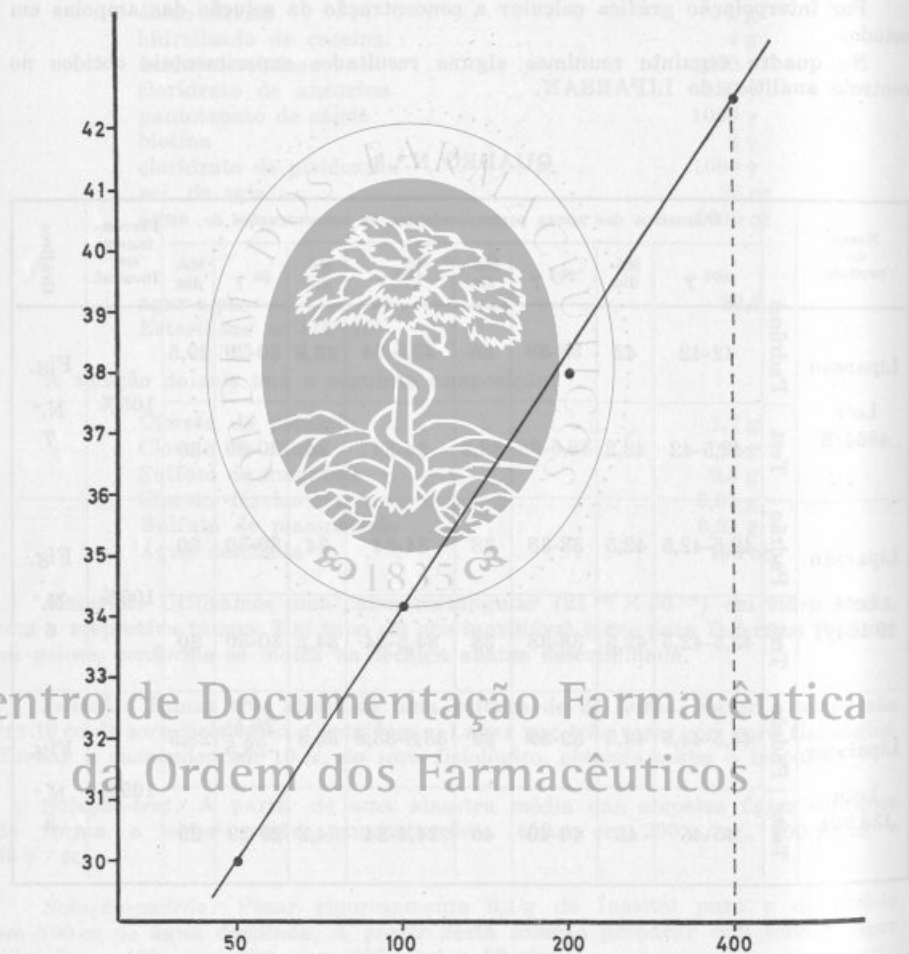


Fig. 6

RESUMO E CONCLUSÕES

Descrevem-se métodos microbiológicos em dois laboratórios, para a análise de Pentacina de C. L. de Aguiar, Lda, em medicamento completo, que a aplicação de técnicas físico-químicas se torna difícil ou pouco eficaz, empregando-se métodos com o Enduro-test 99-1, a Streptomycin Inhibitor e a Streptomycin Colorimetric 422, respectivamente. Pentacina de C. L. de Aguiar, Lda, é um meio sólido e a aplicação de métodos microbiológicos para a análise de pentacina em medicamento completo é impossível.



Fig. 7

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

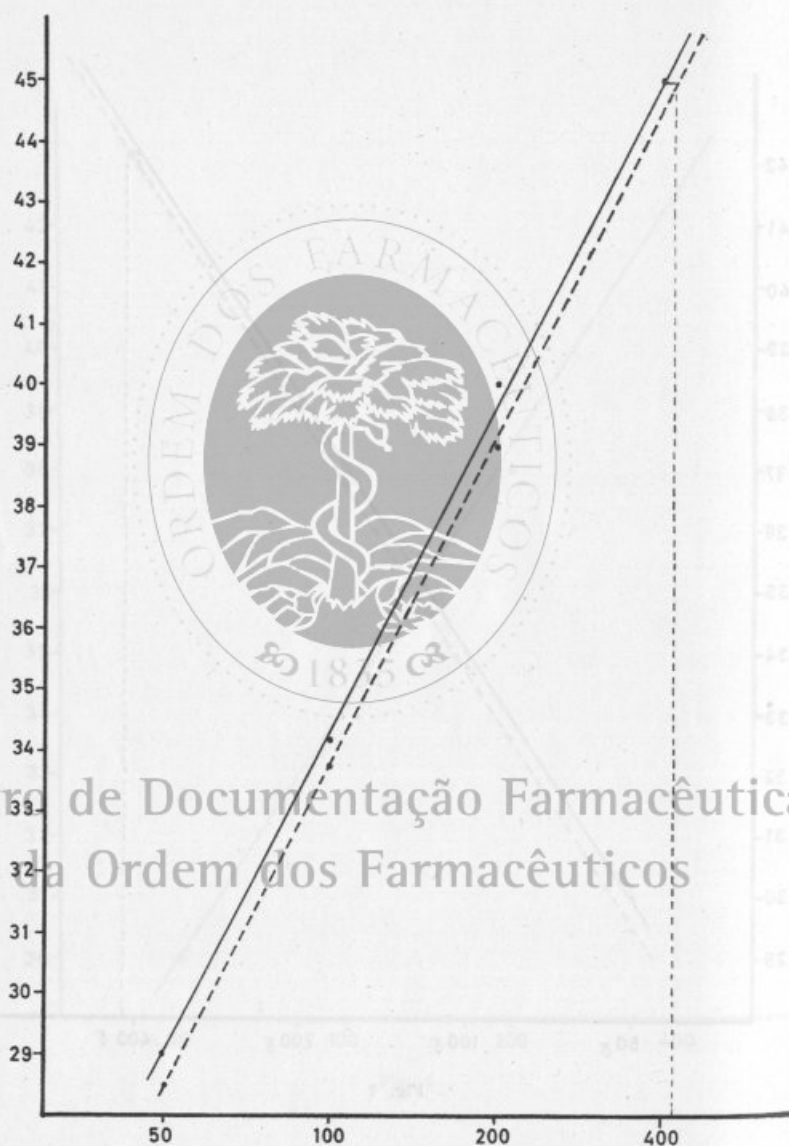


Fig. 8

RESUMO E CONCLUSÕES

Descrevem-se métodos microbiológicos em uso nestes Laboratórios, para doseamento do Pantotenato de Cálcio, Ácido Fólico e Inositol, em medicamentos complexos em que a aplicação de técnicas físico-químicas se torna difícil ou pouco cômoda. Os microorganismos tituladores são o *Escherichia Coli* 99-1, o *Streptococcus lactis* R 9043 e o *Sacharomyces Carlsbergensis* 4228, respectivamente para o Pantotenato de Cálcio (Bêcomvite C, drageias), Ácido Fólico (Bêcomvite, xarope) e Inositol (Liparsan).

O terreno de titulação usado é um meio sólido e o cálculo faz-se por medição do diâmetro das zonas de inibição que é proporcional ao logaritmo da concentração a determinar.

SUMMARY

Microbiological assay methods for Calcium Pantothenate, Folic Acid and Inositol in complex pharmaceutical preparations, difficult to assay by physico chemical methods, are described. Test organisms are *Escherichia Coli* 99-1, *Streptococcus lactis* R 8043 and *Saccharomyces Carlsbergensis* for Calcium Pantothenate, Folic Acid (Bêcomvite) and Inositol (Liparsan) respectively. Basal media are always solid and results are obtained measuring the diameters of the zones of growing which are proportional to the logarithm of concentration.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WILDIERS, E. — *La Cellule*, **18**, 313 (1901).
- (²) SNELL e STRONG: *Ind. and Eng. Ch.* **11**, 346 (1939).
- (³) DAVIS — *J. Bact* **60**, 17 (1950).
- (⁴) CAPPS, HOBBS, FOX: *J. Bact.* **55**, 869 (1948).
- (⁵) A. JONES — *The Analyst*: **76**, 588 (1951).

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

(Trabalho elaborado no Serviço de Estudos e Ensaios Analíticos dos Laboratórios Azevedos).

OS MÉTODOS INSTRUMENTAIS EM ANÁLISE FARMACÉUTICA

GERARDO MATTA

Licenciados em Farmácia

E. S. LOPES

A experiência têm-nos levado a comparar e a substituir com vantagem muitos métodos químicos de análise de medicamentos por métodos instrumentais. O largo predomínio dos primeiros nos laboratórios de verificação analítica tem de se considerar hoje como fruto duma rotina conservadora, bem difícil de justificar na maioria dos casos. Todavia, este juízo crítico não envolve de qualquer forma uma condenação dos métodos clássicos de análise química. Até porque, a volumetria e a gravimetria têm-se renovado notavelmente nos últimos anos, bastando mencionar por exemplo aplicações tão vastas e importantes como as dos métodos complexométricos e das titulações em meio não-aquoso, e as técnicas gravimétricas com tioacetamida e tetrafenil borato de sódio, para compreender o papel que estes métodos continuam a desempenhar ainda hoje em análise.

Torna-se no entanto evidente que em muitos casos é vantajoso substituir os métodos químicos por métodos instrumentais. Decorrem estas vantagens, quer da economia no preço dos reagentes e solventes, quer da economia no tempo, eliminadas como são extracções, filtrações e evaporações, lentas e tediosas, sem prejuízo da precisão e reprodutibilidade dos resultados finais.

Esperamos que os exemplos experimentais que publicamos a seguir possam contribuir para ilustrar os conceitos acabados de enunciar, pondo em marcha como se impõe todo um processo de revisão e reestrutura dos métodos analíticos correntemente usados nos laboratórios de verificação de medicamentos.

PARTE EXPERIMENTAL

DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO INFRAVERMELHO DO MEPROMAMATO, MEBUTAMATO E ACETILCARBROMAL

O método clássico de determinação do meprobamato e do mebutamato comporta uma hidrólise clorídrica de uma hora, seguida de uma evaporação da solução clorídrica a pequeno volume, finalizando com uma titulação pela soda após tratamento com formol (¹).

Verificámos que se obtém um melhor termo do ensaio, com viragem muito mais nítida, pela titulação em meio não aquoso do cloreto de amónio proveniente da hidrólise clorídrica. Esta modificação da técnica implicava o bloqueamento do cloretião com acetato de mercúrio acético e subsequente titulação com ácido perclórico. Avalia-se a grande quantidade de acetato de mercúrio necessária para obter tal resultado.

O problema complica-se ainda mais no caso em que o meprobamato se encontra associado com o acetilcarbromal como acontece em diversas especialidades farmacêuticas (CALMOTONE). O acetilcarbromal interfere no ensaio e torna-se então indispensável introduzir um passo extractivo que separe os dois componentes. Na ausência de um solvente suficientemente selectivo, tivemos de recorrer ao benzeno saturado de meprobamato para o conseguir. Uma primeira extracção benzénica separa o acetilcarbromal e depois uma extracção alcoólica isola o meprobamato. Como este não interfere no doseamento argentimétrico do acetil-

carbromal, inspirado no método bem conhecido para o carbromal (⁷), aquele pode executar-se directamente sobre o resíduo do extracto benzénico.

O resíduo resultante da evaporação do extracto alcoólico sofre a hidrólise clorídrica, permitindo depois o doseamento do meprobamato.

No entanto, a análise quantitativa deste tipo de medicamento, sem espectro utilizável no ultravioleta e de boa solubilidade no clorofórmio, pode realizar-se muito mais rapidamente no infravermelho. O método é particularmente interessante no caso das associações de meprobamato com acetilcarbromal, já que é possível dosear estes dois fármacos num único ensaio.

Para tal torna-se necessário obter os espectros de absorção no infravermelho de soluções clorofórmicas dos fármacos em estudo — meprobamato, mebutamato e acetilcarbromal — e comprovar a sua obediência às leis de Lambert-Beer (fig. 1 a 6).

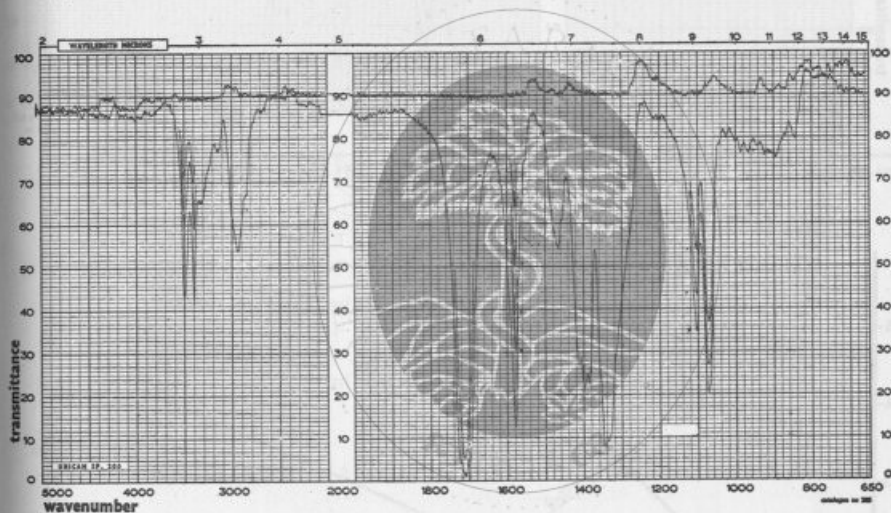


Fig. 1

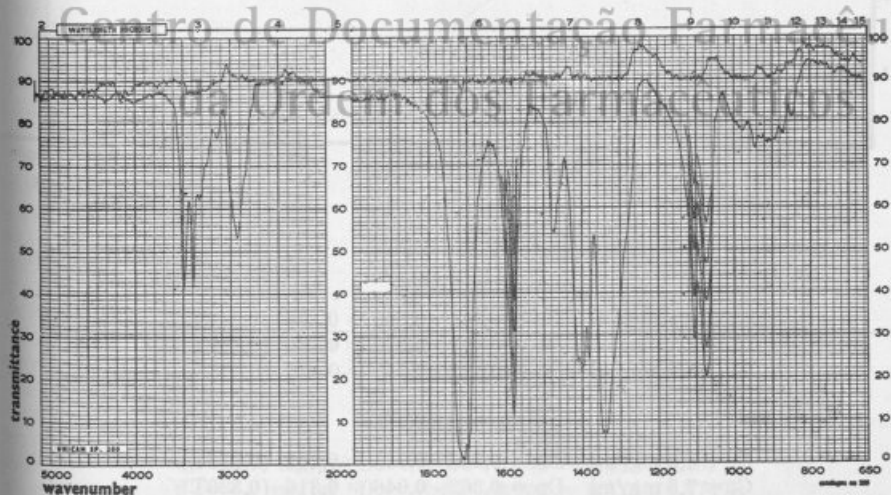


Fig. 2

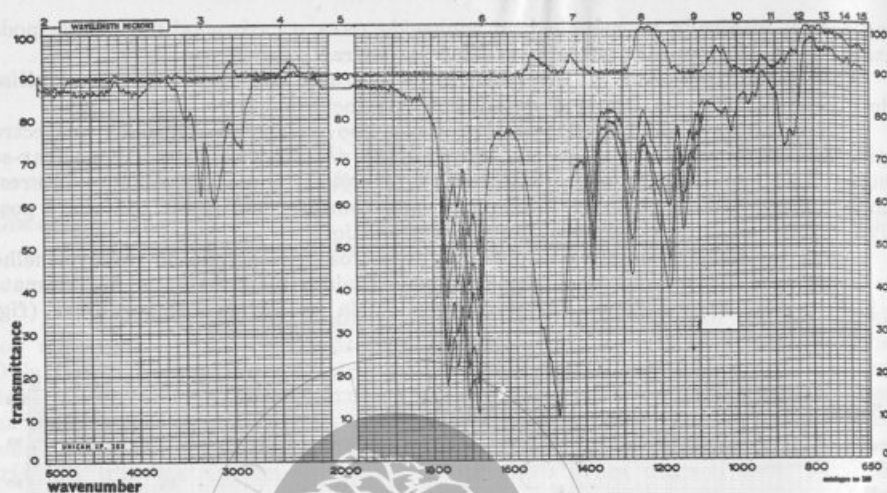


Fig. 3

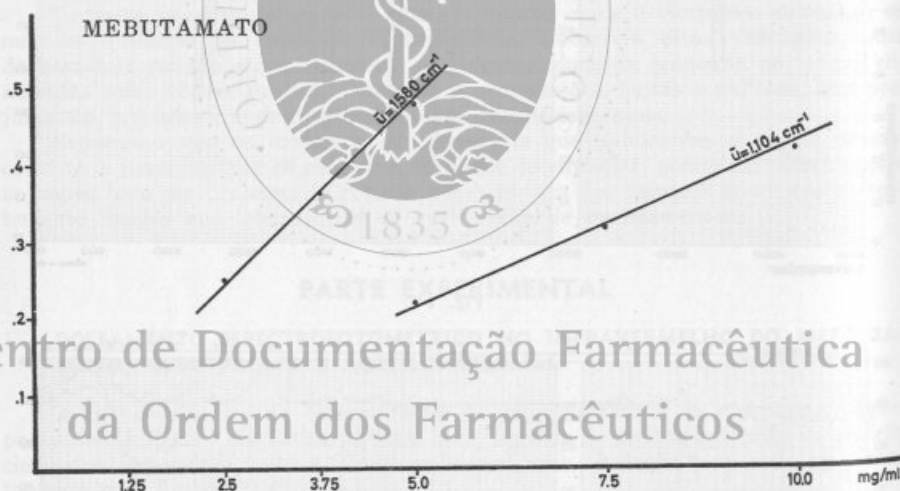


Fig. 4

$$\bar{\nu} = 1580 \text{ cm}^{-1}$$

$$C_1 = 2,5 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,295 - 0,046 = 0,250 \quad (0,243T)$$

$$C_2 = 3,75 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,410 - 0,046 = 0,364 \quad (0,365T)$$

$$C_3 = 5,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,522 - 0,046 = 0,476 \quad (0,486T)$$

$$\bar{\nu} = 1580 \text{ cm}^{-1}$$

$$C_1 = 5,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,268 - 0,046 = 0,222 \quad (0,213T)$$

$$C_2 = 7,5 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,362 - 0,046 = 0,316 \quad (0,320T)$$

$$C_3 = 10,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,460 - 0,046 = 0,414 \quad (0,426T)$$

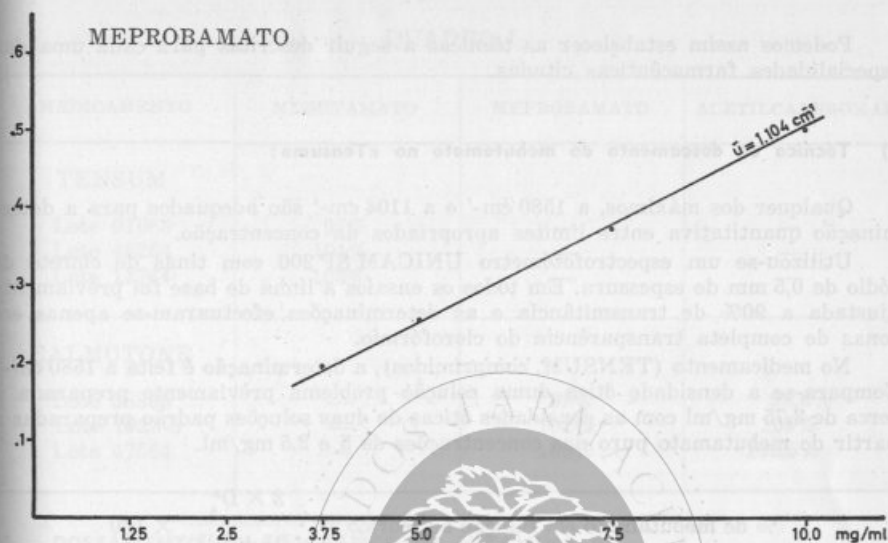


Fig. 5

$$\bar{U} = 1104 \text{ cm}^{-1}$$

$$C_1 = 3,75 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,242 - 0,046 = 0,196 \quad (0,188T)$$

$$C_2 = 5,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,300 - 0,046 = 0,254 \quad (0,251T)$$

$$C_3 = 7,5 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,410 - 0,046 = 0,364 \quad (0,376T)$$

$$C_4 = 10,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,540 - 0,046 = 0,494 \quad (0,502T)$$

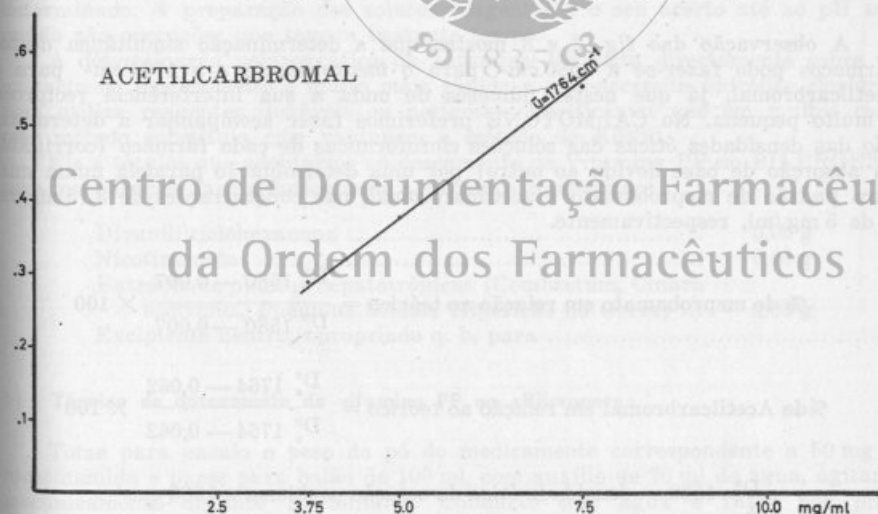


Fig. 6

$$\bar{U} = 1104 \text{ cm}^{-1}$$

$$C_1 = 3,75 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,595 - 0,046 = 0,289 \quad (0,281T)$$

$$C_2 = 5,0 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,420 - 0,046 = 0,374 \quad (0,374T)$$

$$C_3 = 7,5 \text{ mg/ml} \quad D_0 = 0,335 - 0,046 = 0,549 \quad (0,549T)$$

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

Podemos assim estabelecer as técnicas a seguir descritas para cada uma das especialidades farmacêuticas citadas.

o) Técnica de doseamento do mebutamato no «Tensum»:

Qualquer dos máximos, a 1580 cm⁻¹ e a 1104 cm⁻¹ são adequados para a determinação quantitativa entre limites apropriados da concentração.

Utilizou-se um espectrofotómetro UNICAM SP 200 com tinas de cloreto de sódio de 0,5 mm de espessura. Em todos os ensaios a linha de base foi previamente ajustada a 90% de transmitância e as determinações efectuaram-se apenas em zonas de completa transparência do clorofórmio.

No medicamento (TENSUM, comprimidos), a determinação é feita a 1580 cm⁻¹. Compara-se a densidade ótica duma solução problema previamente preparada a cerca de 3,75 mg/ml com as densidades óticas de duas soluções padrão preparadas a partir do mebutamato puro nas concentrações de 5 e 2,5 mg/ml.

$$\% \text{ de mebutamato em relação ao teórico} = \frac{2 \times D_o^x}{D_o^I + D_o^{II}} \times 100$$

D_o^x — densidade ótica da solução problema.

D_o^I e D_o^{II} — densidades óticas das soluções padrão a 2,5 e 5 mg/ml respectivamente.

b) Técnica de doseamento do meprobamato e do acetilcarbromal no «Calmotone»:

A observação das fig. 2 e 3 mostra que a determinação simultânea destes fármacos pode fazer-se a 1580 cm⁻¹ para o meprobamato e a 1764 cm⁻¹ para o acetilcarbromal, já que nestes números de onda a sua interferência recíproca é muito pequena. No CALMOTONE preferimos fazer acompanhar a determinação das densidades óticas das soluções clorofórmicas de cada fármaco (corrigidas da absorção de base devida ao outro) por uma determinação paralela numa mistura padrão de meprobamato e acetilcarbromal, nas concentrações de 3,75 mg/ml e de 5 mg/ml, respectivamente.

$$\% \text{ de meprobamato em relação ao teórico} = \frac{D_o^x 1580 - 0,007}{D_o^p 1580 - 0,007} \times 100$$

$$\% \text{ de Acetilcarbromal em relação ao teórico} = \frac{D_o^x 1764 - 0,062}{D_o^p 1764 - 0,062} \times 100$$

$D_o^x 1580$ — densidade ótica da solução problema a 1580 cm⁻¹

$D_o^p 1580$ — densidade ótica da solução padrão a 1580 cm⁻¹

$D_o^x 1764$ — densidade ótica da solução problema a 1764 cm⁻¹

$D_o^p 1764$ — densidade ótica da solução padrão a 1764 cm⁻¹

No Quadro I sistematizam-se alguns dos resultados obtidos em análises de rotina realizados nos nossos Laboratórios.

QUADRO I

MEDICAMENTO	MEBUTAMATO	MEPROBAMATO	ACETILCARBROMAL
TENSUM			
Lote 91663	97%	—	—
Lote 46264	101%	—	—
Lote 11764	103%	—	—
CALMOTONE			
Lote 38365	—	99%	98,6%
Lote 1923-3	—	102%	105%
Lote 47564	—	100%	102,5%

2 — DOSEAMENTO POLAROGRAFICO DA VITAMINA PP

O doseamento da Vitamina PP em complexos multivitaminados e noutras associações de medicamentos é feita usualmente pelo método colorimétrico de KÖNIG com o brometo de cianogénio (*).

Além do perigo que comporta a preparação e a manipulação deste reagente, o método obriga como se sabe a uma hidrólise clorídrica da nicotinamida, seguida de evaporação a pequeno volume. A reacção de copulação do produto de cisão da molécula piridínica pelo brometo de cianogénio, faz-se com ácido sulfanílico a pH determinado. A preparação dos solutos reagentes e o seu acerto até ao pH adequado são operações que tomam bastante tempo.

A determinação polarográfica da Vitamina PP feita directamente sobre um extracto do medicamento é muito mais rápida e não necessita hidrólise clorídrica nem utiliza reagentes instáveis ou perigosos. Verificámos que em muitos casos este método substitua com vantagem o método de KÖNIG.

Eis a técnica que adoptamos no doseamento da Vitamina PP no BILERGENE, uma preparação farmacéutica com a seguinte composição:

Divanilciclohexanona	0,05 g
Nicotinamida	0,05 g
Extracto de plantas hepatotrópicas (Combretum, Cinara scolumus, Pneumus boldae, Hiperião do Gerez) ...	0,03 g
Excipiente neutro, apropriado q. b. para	

a) Técnica de doseamento da vitamina PP no «Bilergene»:

Tome para ensaio o peso do pó do medicamento correspondente a 50 mg de nicotinamida e passe para balão de 100 ml, com auxílio de 70 ml de água, agitando mecânicamente durante 15 minutos. Complete com água e filtre por placa porosa G 3.

Prepare uma solução padrão a 0,25 g % de nicotinamida em água destilada.

Faça as seguintes diluições a partir destas soluções:

Solução X: 25 ml da diluição problema, mais 5 ml de hidróxido de sódio normal; complete 50 ml com água.

Solução Z: 25 ml da diluição problema, mais 5 ml de hidróxido de sódio normal mais 5 ml da solução padrão de Nicotinamida a 0,25%; complete com água 50 ml.

Passe 20 ml de cada uma destas soluções para a respectiva célula polarográfica. Imediatamente antes da polarografia expulse o oxigénio de ambas as soluções fazendo borbulhar azoto por 10 m na célula polarográfica.

Polarografe as soluções X e Z entre -1,5 e -2,5 voltes. Deduza a percentagem da vitamina PP em relação ao teórico, das alturas de onda obtidas, pela expressão:

$$\% = \frac{h_x}{h_z - h_x} \times 100$$

h_x — altura da onda da solução X.

h_z — altura da onda da solução Z.

Utilizámos para as nossas determinações um polarógrafo ORION com eléctrodo de gotas de mercúrio. Constantes para a polarografia:

Altura da coluna de mercúrio: 370 mm, correspondendo a uma gota de 3 em 3 segundos.

Sensibilidade: 6×10^{-7} A/mm.

Damping: 1.

Corrente do condensador: 1.

Potencial de semi-onda: -1,8 v.

Eis um polarograma típico tomado de uma análise da Vitamina PP do BILERGENE: (Fig. 7).

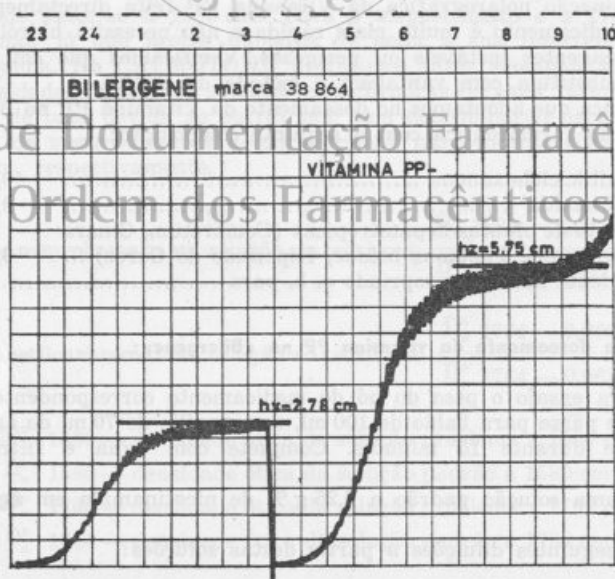


Fig. 7

Alguns dos resultados obtidos por este método encontram-se sistematizados no Quadro II:

QUADRO II

BILERGENE	VITAMINA PP
Lote 42464	96%
Lote 42364	105%
Lote 38864	93%
Lote 30264	99,3%
Lote 1061-4	100%

3 — DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO VISÍVEL DO COLARGOL E DA DIVANILIDENOCICLO-HEXANONA

A espectrofotometria no visível continua a ser um dos métodos instrumentais mais eficazes no doseamento dos fármacos. A sua aplicação estende-se desde a análise dos elementos minerais à das moléculas orgânicas complexas. Vamos ilustrar este facto com dois exemplos.

a) Técnica de doseamento do colargol no «Enteroseptil», comprimidos ou suspensão

No ENTEROSEPTIL estão associados ao colargol, a Vitamina K, a pirlamina, o ftalilsulfatiazol e a neomicina. O colargol pode dosear-se, após destruição da matéria orgânica, por uma colorimetria da prata com ditizona. O método divide-se em duas fases: na primeira procede-se à destruição da matéria orgânica por via húmida e dilui-se até à concentração de trabalho; na segunda realiza-se a reacção corada entre a ditizona e a prata dos solutos padrão e problema. O complexo amarelo que a prata forma com a ditizona, é solúvel no tetracloreto de carbono e já não absorve a 620 m μ . Em espectrofotómetro adequado mede-se a diminuição da cor verde da ditizona. A reacção é quantitativa para concentrações finais de prata da ordem de 1 μ g/ml o que torna possível a sua aplicação ao medicamento em estudo que contém apenas traços de prata.

O protocolo experimental que adoptámos foi o seguinte:

Reagentes: Ácido sulfúrico concentrado p.A.

Sulfato de potássio p.A.

Selénio p.A.

Tetracloreto de carbono p.A.

Ditizona p.A.

Nitrato de prata p. A.

Soluto padrão de prata: Pese 55,1 mg de nitrato de prata e dissolva em balão de 200 ml com água. Tome 1 ml para balão de 100 ml e complete com ácido sulfúrico N/2.

Soluto reagente de ditizona: Pese 25 mg de ditizona e dissolva em balão de 100 ml com tetracloreto de carbono. Tome 2 ml desta diluição para balão de 50 ml e complete com tetracloreto de carbono. Leia a densidade ótica desta diluição contra tetracloreto de carbono em tinhas de 1 cm a 620 m μ . Ajuste a diluição final de forma que a sua densidade ótica esteja compreendida entre 0,760 e 0,780.

Método: Passe para balão de Kjeldhal adequado um peso de medicamento correspondente a 1,25 mg de colargol, arrastando com 6 ml de ácido sulfúrico. Junte 2 g de sulfato de potássio e 40 mg de selénio. Destrua a matéria orgânica na hotte ou com auxílio do aparelho de Benoiel.

Terminada a operação verta para balão de 500 ml ajuste o pH de forma a igualar o da solução padrão e complete o volume. Filtre se necessário.

Passe para pequenas ampolas de decantação 5 ml da solução de ditizona e 5 ml de cada uma das soluções padrão e problema. Agite 1 minuto e deixe separar durante outro minuto. Leia o soluto de ditizona original contra cada um dos solutos padrão e problema, em tinhas de 1 cm, a 620 m μ .

A percentagem de colargol no ENTEROSEPTIL comprimidos ou suspensão obtém-se da expressão:

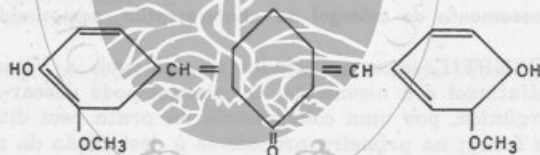
$$\% = \frac{D^x}{D^p} \times 100$$

D^x — densidade ótica lida na experiência problema.

D^p — densidade ótica lida na experiência padrão.

b) **Técnica de doseamento da divanilidenociclo-hexanona no «Bilergene» drageias:**

A divanilidenociclohexanona tem a seguinte fórmula:



Apresenta-se como um pó amarelo, insolúvel na água, ligeiramente solúvel na acetona e no álcool. No BILERGENE, encontra-se associada aos extractos de alcaçofra, boldo e combretum e à vitamina PP. O seu doseamento foi estabelecido no nosso laboratório da seguinte forma:

Tome para ensaio o peso do pó das drageias descorticadas correspondente a 100 mg de DVCH e passe-o para balão de 100 ml com a ajuda de 75 ml de clorofórmio. Agite mecânicamente por 15 minutos. Complete, misture e filtre por placa porosa G 3.

Paralelamente, prepare uma solução padrão contendo 0,100 gramas de DVCH em 100 ml de clorofórmio.

Obedecendo às condições de normalização de Stahl, deposite, 0,01 ml da solução clorofórmica padrão e problema numa placa 20x20 cm com uma camada fina activada de 250 μ de Kieselgel G. Execute o ensaio em triplicado na mesma placa.

Desenvolva em câmara sobressaturada com clorofórmio para cromatografia. Terminada a cromatografia, evapore perfeitamente o solvente.

Raspe cuidadosamente a mancha amarela de Rf mais elevado (100 Rf = 10) e passe o pó, quantitativamente, para tubo de centrífuga. Junte 12 ml de hidróxido de sódio N/10 e misture bem.

Esta reacção provoca a formação de uma côr vermelha, muito mais intensa que a inicial, o que possibilita a determinação espectrofotométrica.

Centrifugue as suspensões obtidas a 7000 r.p.m. durante 15 m. Usando tinhas de 4 cm, leia as densidades óticas das soluções acima preparadas contra hidróxido de sódio N/10, a 485 m μ .

Calcule as médias das densidades óticas das soluções padrão e problema e compare-as. A percentagem de divanilidenociclohexanona em relação ao teórico obtém-se da expressão:

$$\% = \frac{D^x}{D^p} \times 100$$

D^x — média das densidades óticas das soluções problema.

D^p — média das densidades óticas das soluções padrão.

Alguns resultados obtidos com os métodos descritos encontram-se sistematizados no Quadro III:

ENTEROSEPTIL	COLARGOL	BILERGENE	D V C H
Lote 1265-63	100%	Lote 30264	95%
Lote 1627-3	97%	Lote 38864	105%
Lote 32577	101,5%	Lote 43864	100,5%

CONCLUSÕES

Os métodos instrumentais são mais rápidos e, quando criteriosamente escolhidos, tão exactos como os métodos clássicos volumétricos ou gravimétricos. O custo da aquisição dos instrumentos pode ser compensado por uma importante economia de tempo e de reagentes. Frequentemente são específicos, em especial quando incluem um passo cromatográfico. A sua sensibilidade confere-lhes por vezes características únicas na resolução de certos problemas, como por exemplo no doseamento de traços metálicos. Mesmo quando um método instrumental é longo, envolvendo a utilização de reagentes perigosos ou pouco estáveis, torna-se possível substituí-lo frequentemente por outro, mais simples, económico e rápido.

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

SUMMARY

The I. R. spectrophotometric assays of mebutamate, meproamate and acetylcarbromal are described. It is suggested to substitute more frequently the König assay for nicotinamide by the polarographic assay. Protargol is colorimetrically assayed with dithizone and divanilidenocyclohexanone is assayed by a method including thin layer chromatographic separation followed by colorimetry with sodium hydroxide.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) Drug Standards, 88, (1957).
- (²) National Formulary, XI Ed., 77, (1960).
- (³) SNELL e SNELL, Colorimetric Methods of Analysis, III Ed. 4, 257 (1959).

(Trabalho elaborado no Serviço de Estudos e Ensaio Analíticos dos Laboratórios Azevedos).

ATAQUE BACTERIANO DO ÁCIDO CÍTRICO

MARIA MARGARIDA FORMOSINHO VAZ DE OLIVEIRA

Licenciada em Farmácia

O vinho é um produto natural de composição complexa que pela sua riqueza em açúcares redutores, ácidos orgânicos, proteídeos e factores de crescimento, tais como vitaminas, amino-ácidos e sais minerais, se pode tornar um óptimo meio de cultura de bactérias.

No Vinho do Porto resultante de fermentações normais com uma composição equilibrada não se verificam geralmente desenvolvimentos bacterianos. As condições de resistência vão aumentando com a idade, contribuindo para isso as oxidações verificadas, as eliminações de matérias em suspensão pelos tratamentos, clarificações e trasfegas a que o vinho vai sendo submetido, bem como o seu pH e elevado teor alcoólico.

Assim, formas suspeitas e mesmo bactérias que aparecem frequentemente nos exames microscópicos de Vinhos do Porto novos desaparecem com o tempo. Observam-se, no entanto, por vezes desenvolvimentos bacterianos, mesmo em vinhos com teores alcoólicos superiores a 20°, pelo que se torna necessário ter cuidados especiais durante o seu processo de fabrico e envelhecimento para evitar que se alterem, inutilizando-se assim massas vinárias de qualidade e grande valor económico.

As referidas bactérias, embora sejam inofensivas para o homem, modificam a composição do Vinho do Porto, conferindo-lhe má prova e tornando-o, conseqüentemente, impróprio para consumo.

Interessa, portanto, nestes casos eliminar não só as bactérias, como também, nas correcções que se efectuam para corrigir deficiências de composição, evitar o emprego de substâncias que facilitem o seu desenvolvimento.

PARTE EXPERIMENTAL

Partindo de um Vinho do Porto em começo de alteração, realizámos ensaios tendentes a esclarecer a orientação que devia presidir à escolha dos tratamentos a efectuar para o seu aproveitamento.

Tratava-se de um vinho *Tawny* com a seguinte composição:

Álcool (vol.)	19°
Grau Baumé	3°
Extracto seco	114,60 g/l
Extracto isento de açúcar	22,99 g/l
Substâncias redutoras	92,61 g/l
Acidez volátil (C ₂ H ₃ O ₂)	0,93 g/l
Acidez fixa (C ₆ H ₅ O ₆)	2,12 g/l

O exame microscópico do sedimento revelava frequentes bastonetes e filamentos bacterianos mais ou menos alongados e flexuosos.

Este vinho, apesar do seu teor alcoólico, apresentava uma infecção bacteriana, sendo no entanto susceptível de tratamento, uma vez que a acidez volátil se encontrava ainda dentro dos limites legais e a prova não acusava alteração, embora se mostrasse um pouco caído.

Sobressai, assim, que conviria efectuar o seu tratamento de forma a eliminar as bactérias e ao mesmo tempo corrigir a acidez fixa, não só para lhe aumen-

tar as condições de resistência, como também, para o colocar dentro dos limites normais, com melhoria de prova.

Tratando-se de uma bactéria susceptível de provocar a alteração do Vinho do Porto, interessou-nos fazer o seu estudo sob o ponto de vista do seu comportamento perante os principais ácidos fixos do vinho (tartárico, cítrico e málico), em virtude da necessidade que apresentava em ser corrigido na sua acidez fixa.

Começámos por efectuar o seu isolamento em condições de anaerobiose, procedendo-se seguidamente à sua purificação, usando-se, para isso, meio à base de Vinho do Porto adicionado de extracto de levedura.

Procedemos, então, seguidamente ao estudo da actividade fermentativa da estirpe isolada sobre os referidos ácidos fixos, feito pela determinação das variações da acidez total, volátil e fixa originadas pela bactéria, quando inoculada em meios adequados e através do ataque dos mesmos ácidos, verificado por cromatografia sobre papel segundo a técnica de MICHOD.

Com este fim, usou-se uma solução aquosa dos respectivos ácidos, na concentração de 0,5 g%, com extracto de levedura a 2% e levado a um pH compreendido entre 4 e 4,5.

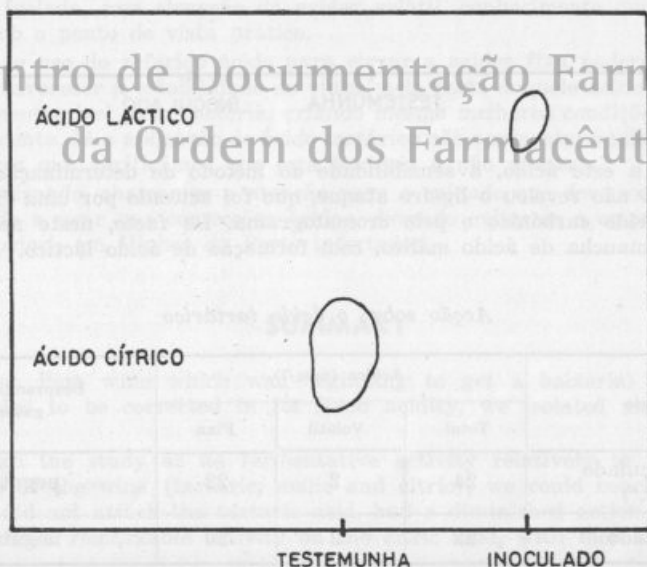
Fez-se a inoculação com 3 gotas de cultura pura da bactéria, tendo-se deixado para cada ensaio um testemunha não inoculado.

Incubaram-se seguidamente os tubos durante 30 dias a 23°C em condições de anaerobiose, ao fim dos quais se procedeu à sua análise.

Damos a seguir os resultados obtidos:

Acção sobre o ácido cítrico

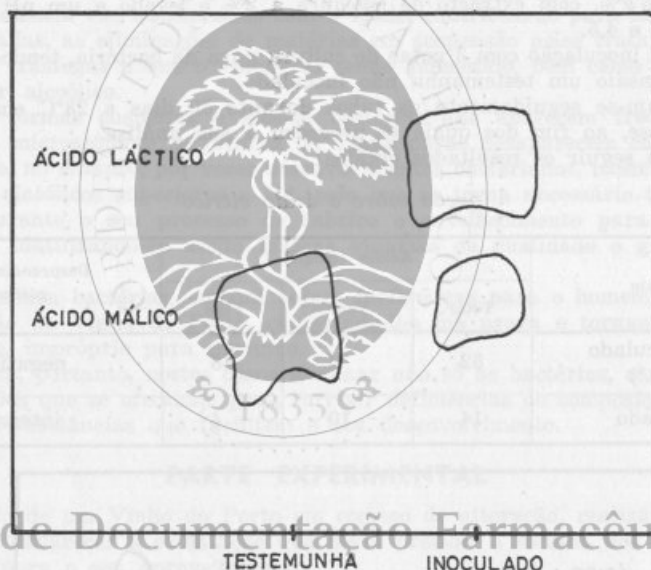
Ensaio	Acidez (meq/l)			Desprendimento gasoso
	Total	Volátil	Fixa	
não inoculado (test.)	52	4	48	negativo
inoculado	14	10	4	intenso



Relativamente a este ácido, verificámos que a bactéria o atacava fortemente, com formação de ácido láctico, ácido acético e libertação de anidrido carbónico.

Acção sobre o ácido málico

Ensaio	Acidez (meq/l)			Desprendimento gasoso
	Total	Volátil	Fixa	
não inoculado (test. ^a)	16	2	14	negativo
inoculado	15	2	13	fraco

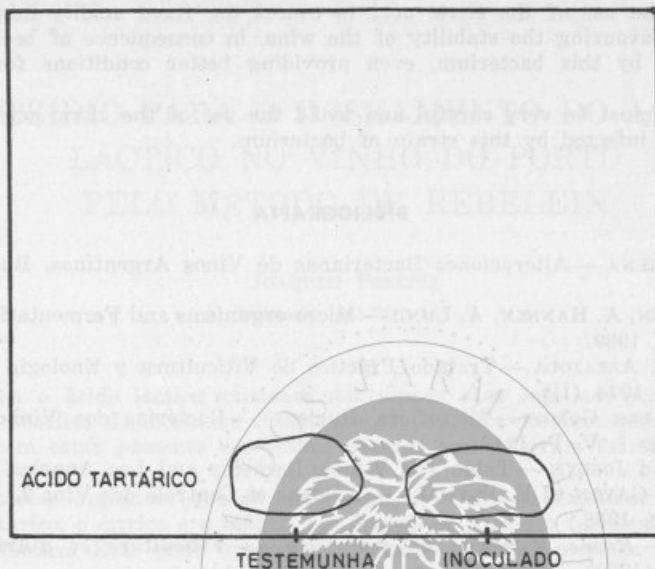


Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

Quanto a este ácido, a sensibilidade do método de determinação da acidez por titulação não revelou o ligeiro ataque, que foi acusado por uma fraca produção de anidrido carbónico e pelo cromatograma. De facto, neste notou-se uma redução da mancha de ácido málico, com formação de ácido láctico.

Acção sobre o ácido tartárico

Ensaio	Acidez (meq/l)			Desprendimento gasoso
	Total	Volátil	Fixa	
não inoculado (test. ^a)	24	2	22	negativo
inoculado	22	2	20	negativo



Em relação a este ácido, verificámos que a bactéria o não atacava, quer através da determinação da acidez, quer pelo cromatograma.

CONCLUSÕES

No tratamento de Vinhos do Porto doentes deve evitar-se o emprego de substâncias que possam facilitar a propagação das próprias bactérias.

No presente estudo, verificámos que o ácido cítrico era atacado pela estirpe bacteriana isolada, com elevação da acidez volátil, conhecimento que tem grande interesse sob o ponto de vista prático.

Assim, o uso do referido ácido para elevar a acidez fixa poderia prejudicar, em vez de favorecer a estabilidade do vinho, pelo facto daquele ácido ser extremamente fermentescível pela bactéria, criando mesmo melhores condições para o seu desenvolvimento. Já a aplicação do ácido tartárico não apresentava tais inconvenientes, uma vez que verificámos que esta bactéria o não atacava.

Generalizando, chamamos a atenção para o cuidado que deve existir na escolha do ácido a usar nas correcções ácidas, devendo evitar-se o emprego do ácido cítrico, à priori, em Vinhos do Porto infectados.

SUMMARY

From a Port wine which was beginning to get a bacterial spoilage and which needed to be corrected in its fixed acidity, we isolated and purified a bacterium.

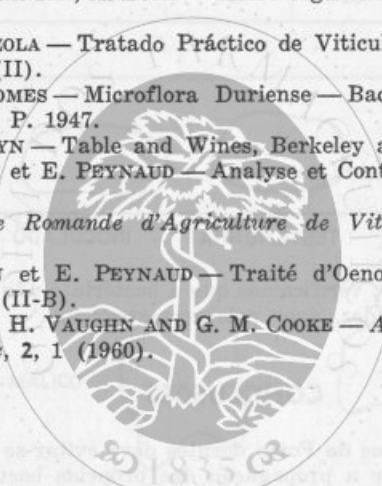
Through the study of its fermentative activity relatively to the principal fixed acids of the wine (tartaric, malic and citric), we could conclude that the bacterium did not attack the tartaric acid, had a diminished action on the malic acid and had a remarkable activity on the citric acid, with increase in volatile acidity.

Thus, the use of the citric acid to correct the fixed acidity might damage instead of favouring the stability of the wine, in consequence of being greatly fermentable by this bacterium, even providing better conditions for its development.

So, we must be very careful and avoid the use of the citric acid to correct Port Wines infected by this strain of bacterium.

BIBLIOGRAFIA

- ANTÓNIO ARENA — Alteraciones Bacterianas de Vinos Argentinos, Buenos Aires. 1936.
- A. JÖRGENSEN, A. HANSEN, A. LUND — Micro-organisms and Fermentation, 6th. ed., London. 1939.
- J. MARCILLA ARRAZOLA — Tratado Práctico de Viticultura y Enología Españolas. Madrid. 1944 (II).
- J. V. MARQUES GOMES — Microflora Duriense — Bactérias dos Vinhos Doentes. Anais do I. V. P. 1947.
- AMERINE and JOSLYN — Table and Wines, Berkeley and Los Angeles. 1951.
- J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD — Analyse et Contrôle des Vins 2.º ed., Partit et Liège. 1958.
- J. MICHOD — *Revue Romande d'Agriculture de Viticulture et d'Arboriculture*, 10, 85 (1959).
- J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD — *Traité d'Oenologie*, Paris et Liège. 1960 (I-B), e 1961 (II-B).
- J. L. INGRAHAM, R. H. VAUGHN AND G. M. COOKE — *American Journal of Enology and Viticulture*, 2, 1 (1960).



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

(Trabalho realizado no Instituto do Vinho do Porto)

SUBSÍDIO PARA O DOSEAMENTO DO ÁCIDO LÁCTICO NO VINHO DO PORTO PELO MÉTODO DE REBELEIN

JOAQUIM PEREIRA

Licenciado em Farmácia

Embora o ácido láctico existente nos vinhos são seja um produto de fermentação alcoólica do mosto ou resultante de posterior fermentação malo-láctica, pode também estar presente em vinhos doentes que sofreram fermentação anormais.

Dos ácidos orgânicos que se encontram no vinho já existiam no mosto de uva o tartárico, o cítrico e o málico, resultando do processo fermentativo o succínico e o láctico. Este pode aparecer também, em muito pequena percentagem, em mostos provenientes de uvas atacadas de fungos no momento da maturação.

A quantidade de ácido láctico formado por fermentação alcoólica não atinge, em geral, um grama por litro, podendo a fermentação malo-láctica elevá-lo para alguns gramas por litro em certos tipos de vinho, provocando uma melhoria na sua qualidade. Esta melhoria é proveniente do desaparecimento do ácido málico, de força ácida mais acentuada, e sua substituição pelo ácido láctico, de sabor menos acre.

O caso é designadamente acentuado em certos «grands vins» franceses e no nosso vinho verde.

Certas condições anormais, mal conhecidas, podem dar origem a quantidades avultadas de ácido láctico, como demonstrou BRÉMOND ao estudar vinhos argelinos que chegaram a atingir 12 gramas por litro. É também um dos produtos da fermentação manítica do açúcar, acompanhando o manitol e o ácido acético (vinhos agri-doces).

Pode ainda aparecer nos vinhos em resultado de diversas doenças bacterianas, por decomposição do ácido tartárico, glicerol e açúcares.

O conhecimento do seu teor nos vinhos constitui um precioso elemento para o diagnóstico de certos estados patológicos do meio: esse teor, conjugado com o do ácido málico, permite ao enólogo determinar o momento conveniente do engarrafamento, quer seja para aproveitar a libertação gasosa de anidrido carbônico, a fim de imprimir ao vinho a característica «agulha», quer para evitar que a fermentação malo-láctica se vá produzir no vinho depois de engarrafado, no caso dos vinhos para serem submetidos a longo envelhecimento.

Por isso têm sido numerosos os investigadores que se dedicaram ao estudo de métodos destinados a dosear o ácido láctico, procurando eliminar as substâncias perturbadoras existentes no próprio vinho, entre as quais se contam os açúcares.

Tratando-se do Vinho do Porto, são estes que constituem um dos principais obstáculos a transpor, quando se pretende adoptar técnicas analíticas que, aplicadas a outros vinhos, resultaram bem.

No método que adoptámos, esta dificuldade é vencida pelo emprego duma resina de permuta iónica que, fixando os iões orgânicos, deixa passar através da coluna as substâncias que poderiam interferir na análise.

Segundo o seu autor, o teor em açúcares, álcool, matérias corantes e taninos não influencia a precisão do método. Tivemos ocasião de verificar, por experimentação própria, que a quantidade de etanal pré-existente também não tinha qualquer interferência na titulação final.

PARTE EXPERIMENTAL

I — REAGENTES

a) Para o tratamento preliminar do vinho

Permutador de aniões fortemente básico (III da Merck)

O permutador deve encontrar-se sob a forma de acetato. Para isso, conservar-se-á pelo menos durante um dia sob ácido acético a 30%. Todavia é preferível constituir uma reserva mais importante, que se manterá sob o ácido acético a 30% (verter-se-ão 200 ml de ácido acético a 30% sobre cerca de 100 g de permutador).

Ácido acético a 30%: Introduzir 300 ml de ácido acético cristalizável num balão e completar o volume de um litro com água destilada.

Ácido acético a 0,5%: Introduzir 5 ml de ácido acético cristalizável num balão e perfazer um litro com água destilada.

Solução de sulfato de sódio a 7,1% = 0,5 M

A elução exige uma reserva mais importante deste reagente: Fazer dissolver na água 355 g de sulfato de sódio anidro e completar com água destilada o volume total de 5 litros.

b) Para o doseamento do ácido láctico

Preparação da solução 0,1 M de sulfato cérico em H_2SO_4 , 0,7 N: fazer dissolver a frio 41,2396 g de $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ em 357,0 ml de H_2SO_4 , 2N colocado num balão aferido de 500 ml, agitando frequentemente. (Convém não aquecer, pois que se forma um óxido cérico insolúvel). Completar até ao traço, misturar cuidadosamente e juntar 10 ml de água.

Depois duma nova agitação muito cuidadosa, tomar 10 ml da solução, que se vertem num matrás de Erlenmeyer, juntar 30 ml de água, depois precipitar o sulfato de cério, agitando, por meio de 10 ml do licor titulado de soda 2,5 N. Lançar sobre um filtro de pregas, tomar 25 ml. do filtrado e titular com uma solução ácida 0,1 N em presença da fenolftaleína.

Seja um consumo de a ml. Teòricamente foi preciso empregar 15 ml de ácido titulado.

Transvasar quantitativamente os 500 ml restantes de sulfato cérico para um balão aferido de 1 litro, depois juntar, agitando sempre, tantos ml de soda N quantos correspondem ao produto, isto é $(15-a) \times 10$.

Uma precipitação passageira de hidróxido cérico, que se dissolve rapidamente, não tem importância.

Completar o litro e misturar. O licor assim preparado contém 40,431 g de sulfato cérico (=0,1 M) num meio ácido 0,7 N.

Solução titulada de Na OH, 2,5 N

Solução de acetato de sódio a 27%

Fazer dissolver 270 g de acetato de sódio seco em água e completar até 1 litro.

Solução titulada de H_2SO_4 , 2N

Solução de nitroprussiato de sódio a 2%

Dissolver 2 g de nitroprussiato de sódio pulverizado em água e completar a 100 ml. Conservar tapado e na obscuridade. A solução não deve ter mais de 8 dias.

Solução de piperidina a 10%

Deitar 10 ml de piperidina num balão e completar a 100 ml. (Conserva-se durante 2/3 semanas).

2 — PREPARAÇÃO DO VINHO PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO ÁCIDO LÁCTICO

a) Preparação da coluna de permutador de iões

Um tubo de vidro de 10-11 mm de diâmetro interior e cerca de 25 cm de comprimento, é munido numa das extremidades duma torneira que atravessa uma rolha de borracha.

O tubo de vidro da torneira não deve ultrapassar a superfície interior da rolha de borracha, a fim de evitar qualquer espaço morto.

Recobrir a rolha com um tampão de algodão de vidro com uma altura de 2-3 mm, encher o tubo com água que se deixará correr até cerca de 5 mm acima do algodão de vidro.

Encher o tubo com cerca de 10 ml da suspensão de permutador de iões sob a forma acetato, evitando as bolhas de ar. Para isso, pôr em suspensão, por agitação, a resina conservada sob o ácido acético a 30% e deitá-las rapidamente no tubo por meio dum funil. Deixar depositar o permutador de iões. Colocar um tampão de algodão de vidro através do líquido por meio duma vareta de vidro até à superfície do permutador depositado. Evita-se assim que durante as lavagens posteriores o permutador depositado seja posto em suspensão. A resina não pode servir senão uma só vez.

Para o doseamento seguinte, a eliminação do permutador velho efectua-se muito simplesmente ligando a torneira aberta a um tubo ligado à conduta de água. A pressão da água da conduta expulsará todo o conteúdo, excepto o tampão de algodão de vidro da base que fica habitualmente no seu lugar.

b) Isolamento dos ácidos por meio dos permutadores de iões

Estando aberta, a torneira de escoamento, deixar esgotar o ácido acético a 30% até cerca de 2-3 mm acima do tampão de algodão de vidro da parte superior. Juntar então cerca de 10 ml de ácido acético a 0,5% e marcar com lápis gordo o lugar do nível do líquido. Continuando a torneira de escoamento aberta, deixar correr de novo o líquido até 2-3 mm acima do tampão de vidro da parte superior.

Recomeçar ainda 4 vezes esta operação de lavagem com cerca de 10 ml de ácido acético a 0,5 %, sendo a coluna cheia de cada vez até ao traço de referência.

Depois da última lavagem, estando a torneira fechada, deitam-se sobre a resina 10 ml de vinho ou de mosto. (A concentração em açúcar, álcool, matéria corante ou tanino não é de tomar em consideração).

Deixar correr o vinho gota a gota, de modo a não ultrapassar um débito de 1 a 1,5 gotas por segundo (o que corresponde a um esgotamento de 25-30 ml em 10 minutos) sustando o esgotamento justamente acima do nível do tampão superior. Encher de novo o tubo com o ácido acético a 0,5% até ao traço de referência. Deixar escoar ao mesmo ritmo que anteriormente e lavar em seguida ainda 7 vezes da mesma maneira com 10 ml de água de cada vez. É recomendável efectuar as lavagens com água, por meio da garrafa de lavagem, regando as paredes do tubo até ao traço de referência.

Na última lavagem, fechar a torneira logo que o nível do líquido se encontre um pouco acima do tampão superior.

Utilizar em seguida como receptor um balão aferido de 100 ml. Eluir os ácidos fixados sobre o permutador por meio duma solução de sulfato de sódio 0,5 M até ao traço de aferição. Para isso é conveniente servir-se dum frasco de tubuladura cheio com a solução 0,5 M, cuja tubuladura inferior é ligada ao tubo de permutador por meio dum tubo de borracha (com uma pinça de parafuso regulável, um tubo afilado e uma rolha de borracha). Estando os dois aparelhos assim ligados, abrir a pinça de parafusos, elevar um pouco a rolha de borracha para permitir o escoamento da solução de sulfato de sódio até enchimento do tubo sobre uma altura de cerca de 10 cm, sendo então feita a ligação entre os aparelhos definitivamente e de forma hermética. Ao abrir a torneira, a solução de sulfato de sódio escoar-se por baixo à mesma cadência que o tubo se enche.

Regula-se o escoamento ao ritmo de 2-3 gotas por segundo, abandonando o sistema a ele mesmo até que o balão receptor esteja cheio até o seu traço de aferição.

3 — DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO ÁCIDO LÁCTICO NO ELUATO

Misturar com cuidado o eluato contido no balão aferido de 100 ml e proceder às operações seguintes:

Introduzir 10 ml do eluato num tubo de ensaio de larga abertura com rolha de vidro, de cerca de 50 ml de capacidade, e juntar-lhe 10 ml do reagente de sulfato cérico. Agitar, depois mergulhar o tubo num termóstato bem eficaz, previamente levado a 65°C, onde ficará exactamente durante 10 minutos. (Imediatamente após a imersão, levantar durante alguns segundos a rolha de vidro, para compensar a pressão devida ao aquecimento do ar. Obtida a compensação da pressão do ar, fechar herméticamente o tubo, a fim de evitar as perdas do acetaldeído formado). Passados 10 minutos, retirar o tubo, arrefecê-lo em água corrente para levar à temperatura de cerca de 20°C, depois juntar 5 ml da solução de soda 2,5 N, misturar bem e lançar sobre um filtro de pregas.

Tomar 15 ml do filtrado que se deitam num proveta com rolha de vidro de 50 ml de capacidade, contendo já uma mistura bem homogênea formada por 5 ml de solução de acetato de sódio a 27% e 2 ml de ácido sulfúrico 2N. Juntar ainda 5 ml da solução de nitroprussiato de sódio e misturar bem. Depois duma adição de 5 ml da solução de piperidina, misturar imediatamente e introduzir rapidamente na cuba de 10 mm de espessura. A coloração produzida que varia do verde ao violeta é medida em relação a uma camada equivalente de ar a 570 m μ de comprimento de onda, escolhendo, como para o doseamento do butilenoglicol, a extinção máxima como valor definitivo. Se necessário, a medida pode ser praticada a 530 m μ .

A leitura tem de ser feita rapidamente, dentro de 30 a 40 segundos, quando o máximo de intensidade de coloração é atingido.

O modo operatório descrito em IV fornece uma curva padrão que indica o teor do vinho em g/l de ácido láctico.

Se o teor de ácido láctico ultrapassar os limites de medida do fotocolorímetro utilizado, repetir a determinação escolhendo uma diluição apropriada do eluato, por meio da solução de sulfato de sódio a 7,1% (e não com água!).

Exemplo: 10 ml de eluato são diluídos com 10 ml da solução de SO_4Na_2 , donde se retiram 10 ml para o doseamento. Os números assim obtidos serão multiplicados por 2.

4 — ESTABELECIMENTO DA CURVA PADRÃO

Tomar 10 ml duma solução de ácido láctico N e juntar 10 ml de solução titulada de soda N e completar a 1 litro com a sol. de SO_4Na_2 a 7,1%. Tomar 5, 10, 15, 20 e 25 ml que se introduzem em pequenos balões aferidos de 100 ml.

Completar o volume com a sol. SO_4Na_2 a 7,1%. Retirar de cada balão 10 ml e determinar os valores de extinção, como foi dito em III.

As diferentes soluções-tipo correspondem ao eluato dum vinho que contenha 0,45, 0,9, 1,35, 1,80 e 2,25 g/l de ácido láctico.

Os valores de extinção reunidos por um traço, constituem, em função do teor de ácido láctico, uma recta.

Para verificar o rigor do método e possibilidade de execução, fizeram-se ensaios com vinhos de pasto estremes e com os mesmos depois de adicionados de quantidades variáveis de ácido láctico.

Os vinhos foram passados pela coluna permutadora de aniões, seguindo-se a técnica já exposta. Sobre a solução dos ácidos orgânicos eluídos, procedeu-se à oxidação do ácido láctico e sua determinação, com a necessária rapidez, utilizando um espectrofotómetro Unicam SP 600 e fazendo a leitura a $570\text{ m}\mu$ de comprimento de onda e em cubas de 5 mm de espessura.

Os resultados obtidos com os vinhos de consumo, antes e depois da adição de ácido láctico, são apresentados no Quadro I.

QUADRO I

Vinhos de consumo	Ácido láctico g ‰	Diferença g ‰
Branco maduro	1,88	
Idem + 0,05 g ‰ de ácido láctico	1,96	+0,03
Branco verde	0,35	
Idem + 0,1 g ‰ de ácido láctico	0,48	+0,03
Tinto Verde	1,70	
Idem + 0,7 g ‰ de ácido láctico	2,37	- 0,03
Idem + 0,5 g ‰ de ácido láctico	2,25	+0,05
Branco maduro	1,79	
Idem + 1 g ‰ de ácido lác- tico	2,70	- 0,09

Seguidamente procedeu-se a idêntico estudo com Vinhos do Porto de vários tipos, a fim de averiguar se a precisão do método empregado se mantinha para vinhos de composição química tão distinta.

Foram também pouco sensíveis as diferenças encontradas para os valores de ácido láctico determinados nos vinhos antes e após a junção deste ácido.

No Quadro II referem-se os números determinados.

QUADRO II

Vinhos do Porto	Ácido láctico g ^o /100	Diferença g ^o /100	Substâncias reductoras em g ^o /100 de açúcar invertido	Acidez volátil em g ^o /100 de ácido acético
N.º 77 686 — Branco Seco	0,43		39,97	0,60
Idem+1 g ^o de ácido láctico	1,45	+0,02		
N.º 77 998 — Tawny	0,19		106,81	0,42
Idem+1 g ^o de ácido láctico	1,25	+0,06		
N.º 77 405 — Lágrima	0,10		143,72	0,39
Idem+1 g ^o de ácido láctico	1,12	+0,02		
N.º 176 — Branco Seco	0,61		17,70	0,42
Idem+1 g ^o de ácido láctico	1,55	-0,06		
N.º 177 — Branco Seco	0,21		13,50	0,60
Idem+1 g ^o de ácido láctico	1,22	+0,01		

Como se pode ver pelos números referidos nos Quadros I e II, apesar de se ter operado sobre vinhos de características muito diferentes, especialmente no concernente à riqueza em matéria corante e em açúcar, não se notou qualquer influência motivada pela oscilação dos teores destas substâncias.

Verificado o rigor do método e sua exequibilidade, embora de técnica delicada, em virtude da rapidez com que se desenvolve a cor, cuja intensidade vai ser medida, fizemos diversos ensaios sobre Vinhos do Porto de tipos variados com vista a um conhecimento mais preciso sobre o teor do ácido láctico deste vinho generoso.

A concentração deste ácido nos vinhos analisados vem indicada no quadro que se segue:

Pode observar-se, dum modo geral, que o teor de ácido láctico é baixo, o que não causa estranheza, visto tratar-se de vinhos obtidos por fermentação incompleta do mosto e adicionados duma quantidade apreciável de aguardente vínica que, a par duma diluição sensível do vinho, obsta a que se processem as fermentações secundárias em que normalmente se forma o ácido láctico.

Encontram-se neste quadro dois valores excepcionalmente elevados. Dizem respeito a vinhos doentes por actividade bacteriana manítica que, além da elevada concentração em ácido láctico, evidenciaram caracteres organolépticos francamente maus, acidez volátil muito alta e revelaram a presença de cristais de manite.

QUADRO III

Vinhos do Porto	Ácido láctico g %/100	Substâncias reductoras em g %/100 de açúcar invertido	Acidez volátil em g %/100 de ácido acético
N.º 77 686 —			
Branco Seco	0,43	39,97	0,60
N.º 77 405 — Lágrima	0,10	143,72	0,39
N.º 176 — Branco Seco	0,61	17,70	0,42
N.º 177 — Branco Seco	0,21	13,50	0,60
N.º 79 311 — Tawny	0,32	115,24	0,36
N.º 79 644 — Tawny	0,21	100,81	0,51
N.º 80 557 — Tawny	0,21	103,30	0,54
N.º 82 142 — Vintage	0,10	108,68	0,42
N.º 82 143 — Vintage	0,10	110,13	0,42
N.º 82 232 — Tawny	0,20	106,81	0,48
N.º 80 509 — Tawny	0,89	90,91	0,72
N.º 79 896 —			
Tipo Vintage	0,21	110,62	0,42
N.º 80 271 — Tawny	0,17	96,87	0,42
N.º 20 538 —			
Tipo Vintage	0,31	115,16	0,60
N.º 179 — Tinto Seco	0,19	45,46	0,42
N.º 202 — Branco Seco	0,29	38,63	0,66
N.º 203 — Tinto Seco	3,40	22,20	1,86
N.º 148 — Tinto Seco	3,25	18,71	1,30
N.º 82 449 — Tawny	0,82	99,33	0,60
N.º 82 450 — Full	0,23	108,21	0,42

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos verifica-se que o método estudado se mostrou eficiente, reprodutível e dotado dum apreciável rigor em todos os vinhos ensaiados, mesmo no caso do Vinho do Porto, no qual os aspectos da sua composição, riqueza alcoólica, matéria corante e concentração em substâncias reductoras, costumam constituir um óbice ao emprego generalizado dos métodos analíticos.

A única dificuldade que encontramos na prática do método de Rebelein foi o tempo escasso (30 a 40 segundos) em que tem de se fazer a reacção final e a leitura espectrofotométrica da cor desenvolvida.

SUMMARY

M. Rebelein's dosage method of lactic acid was tested on several species of Port Wine, accomplishing the isolation of this acid by means of a strongly alkaline ion exchanging resin.

After the elution of the carboxylic acids, the ceric oxidation of the lactic acid was provoked and the etanal formed through the colored reaction that this compound produces with the sodium nitroprusside and piperidine, was spectrophotometrically dosed.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) M. REBELEIN — Dosage colorimétrique de l'acide tartrique et de l'acide lactique dans le vin et le mout. Office International de la Vigne et du Vin.
- (²) J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD — Analyse et contrôle des vins, 1958.
- (³) P. JAULMES — Analyse des vins, 1951.
- (⁴) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists — 9.^a Ed., 1960.



(Trabalho realizado no Instituto do Vinho do Porto)

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

ESTUDO DE UM MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA O DOSEAMENTO DO FÓSFORO NOS ALIMENTOS PARA ANIMAIS

JOAQUIM PEREIRA
Licenciado em Farmácia

Há muito tempo se fazia sentir a necessidade dum diploma oficial que viesse disciplinar e regulamentar a indústria de rações para animais, tanto no sentido de fixar limites para os componentes mais importantes dessas rações, como para estabelecer métodos analíticos uniformizados, de molde a que a confusão não prevalecesse neste campo de primordial importância para a obtenção de fórmulas reproduzíveis e estáveis.

A lacuna existente no importante ramo da economia nacional, da pecuária, foi preenchida pelo Decreto-Lei n.º 42.979, que fixa doutrina sobre as características a que hão-de satisfazer os alimentos para animais.

Houve especial cuidado no que diz respeito aos elementos energéticos e plásticos, fixando-se para os prótidos, além dum teor mínimo para a proteína total, uma determinada percentagem para a proteína solúvel; exige-se, ainda, que parte dessa proteína seja de origem animal, para o necessário equilíbrio em amino-ácidos essenciais.

Quanto aos componentes minerais, não houve menor preocupação, pelo que se estabeleceram limites para a relação cálcio-fósforo.

Estas rações, de reconhecida necessidade como alimentos de compensação para os animais em liberdade ou nas ocasiões de escassez de pastos, tornam-se indispensáveis para a alimentação de animais estabulados e para as aves em regime de reclusão. Não devemos esquecer a importância que hoje se vem dando à alimentação de animais produtores de peles para agasalhos, bem como de cães, aparecendo nos mercados dos países mais desenvolvidos produtos destinados a suprir ou corrigir a alimentação destes animais.

Se é certo que todas as determinações analíticas nos merecem cuidadosa atenção, não podemos deixar de confessar que a relação Ca/P nos obrigou a estudo mais profundo, não só pela diversidade das técnicas existentes, mas ainda por termos conhecimento de que as entidades oficiais responsáveis pela orientação ou fiscalização das indústrias que se dedicam ao fabrico de rações para animais, não adoptam os mesmos métodos de análise. Nesta conformidade, pareceu-nos mais avisado seguir os métodos adoptados pelos Laboratórios de Fiscalização da I. G. P. A. I. (*) que, no que respeita ao cálcio e ao fósforo, são os da A. O. A. C. (**).

No caso deste último elemento o método gravimétrico de dupla precipitação, terminando pela pesagem do pirofosfato de magnésio, continua a ser considerado como o mais rigoroso. Tem, porém, o inconveniente de ser demorado e trabalhoso. Por isso, para as análises de rotina procurámos utilizar outro método que fosse de mais pronta execução e suficientemente exacto.

(*) Inspeção Geral dos Produtos Agrícolas e Industriais.

(**) Association of Official Agricultural Chemists.

Nesta disposição e visto que os Métodos Officiais da A. O. A. C. referem mais dois processos analíticos para o doseamento do fósforo, sendo um volumétrico e outro colorimétrico, inclinamo-nos pela experimentação e ensaio do primeiro, pois que não dispúnhamos dum espectrofotómetro para executar o segundo.

Ensaando o método volumétrico em comparação com o ponderal atrás referido, verificámos que os resultados deste último eram por vezes pouco exactos, facto que já tinha sido referido por WILLIAM HOFFMAN (*). Por isso, tentámos a aplicação dum outro método, já estudado para o doseamento do fósforo nos vinhos e que a seguir descrevemos, depois de termos feito algumas modificações para o tornar mais fácil de executar, sem prejuízo da sua exactidão.

O resultados obtidos foram animadores, quer operando com soluções puras de sal de fósforo, quer com rações compostas ou ainda com matérias primas.

PARTE EXPERIMENTAL

1 — REAGENTES

- 1) Ácido clorídrico concentrado ($d=1,19$).
- 2) Ácido clorídrico a 10% — Diluir 278 ml do ácido concentrado e completar o volume de 1 litro com água destilada.
- 3) Ácido nítrico concentrado ($d=1,40$).
- 4) Ácido nítrico diluído (1+2) — 1 volume do ácido concentrado para 2 de água destilada.
- 5) Amónia ($d=0,910$).
- 6) Amónia diluída (1+4) — 1 volume de amónia para 4 de água destilada.
- 7) Formaldeído a 40% p/v, neutralizado em presença da fenolftaleína.
- 8) Solução de 0,2 g de azul de bromotimol em 100 ml de álcool a 50.º em volume.
- 9) Solução de molibdato de amónio a 5% p/v.
- 10) Solução de nitrato de amónio a 50% p/v.
- 11) Solução de nitrato de amónio a 10% p/v.
- 12) Solução de nitrato de magnésio a 50% p/v.

Adjuvante de filtração: Celulose em pó Whatman «Standard grade».

2 — MINERALIZAÇÃO

a) Por via seca

Para uma cápsula de porcelana ou de sílica, pesar 5 gramas de produto moído, queimar cuidadosamente e incinerar a temperatura que não exceda 550° C. Obtidas as cinzas, juntar 20 ml de HCl a 10% e evaporar a b.m., mantendo à temperatura da ebulição durante uma hora, para insolubilizar a sílica que possa existir. Juntar 10 ml de HCl a 10%, algumas gotas de HNO₃ concentrado e aquecer, como antes, durante alguns minutos, cobrindo a cápsula com um vidro de relógio.

Finalmente, arrastar a solução ácida, com água quente, para um balão de 250 ml, através de filtro quantitativo. Depois de arrefecimento da solução, completar o volume. Aproveitar o residuo retido no filtro para dosear as cinzas insolúveis no HCl a 10%.

Da solução tomam-se alíquotas para dosear o cálcio e o fósforo.

b) Por via seca, com adjuvante

Pesar 5 gramas de produto moído para uma cápsula, juntar 5 a 10 ml da solução de nitrato de magnésio a 50%, que se misturam bem com a farinha por por meio de vareta de vidro. Com um pequeno pedaço de papel de filtro limpar a vareta e colocar aquele na cápsula. Evaporar a banho-maria, completar a secagem a banho de areia e calcinar na mufla até obtenção de cinzas. Juntar a estas 20 ml de HCl a 10% e continuar como em a).

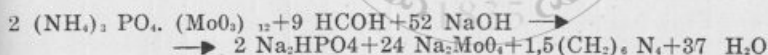
3 — DETERMINAÇÃO

Medir 50 ml da solução das cinzas para um matrás de 300 ml, com rolha esmerilhada, juntar 25 ml de solução de nitrato de amónio a 50%, 25 ml de água e duas gotas de solução de azul de bromotimol. Neutralizar com a amónia (1+4) até viragem para azul, adicionar 15 ml de HNO₃ (1+2), aquecer a 30 — 40° C e juntar 40 ml de solução de molibdato de amónio a 5%. Vascolear, fortemente, durante um minuto, e repetir a operação 4 a 5 vezes, agitando apenas durante alguns segundos, até completar o tempo de contacto de 15 a 20 minutos.

Filtrar por camada de celulose com cerca de 2 mm de espessura (6 a 7 decigramas de pó) montada em funil de placa filtrante 3G3 de Schott e Gen. Depois de lavar uma vez com solução de nitrato de amónio a 10%, repetir a lavagem 5 a 6 vezes com água fria. Verificar se o filtrado já não dá reacção ácida, com papel indicador, não se preocupando com algum precipitado que fique aderente à parte interna do matrás. Arrastar a celulose com o precipitado, por meio de esguicho de água, para o Erlenmeyer em que se fez a precipitação.

Juntar 25 a 50 ml de soda N/2, segundo a quantidade de fosfomolibdato existente, agitar até dissolução completa e adicionar 10 ml de formol neutralizado. Se for necessário, juntar mais fenolftaleína. Titular com ácido clorídrico N/2.

A reacção que se passa é, segundo P. Garoglio (5):



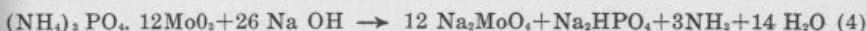
Donde 1 ml de NaOH, N/2 = 1,365 mg de P₂O₅ ou 0,5957 mg de P.

$$P\% = (n-n') \times 0,0005957 \times \frac{250}{50} \times \frac{100}{p}$$

Os valores quantitativos determinados por este método são apresentados no quadro que se segue, em confronto com os obtidos por outros métodos.

Pôs-se em evidência a coluna ocupada pelo método volumétrico da A. O. A. C. por precisarmos de fazer referências especiais a este método. Depois dos primeiros doseamentos em que se seguiu exactamente a técnica indicada em 2.022 (a) da A. O. A. C. e cujos resultados não satisfizeram, como já referimos, chegou ao nosso conhecimento a comunicação de William Hoffman com a afirmação que transcrevemos: «this method has one major fault: the end point and equivalence point are different».

Resolvemos fazer mais ensaios em que se modificou apenas a parte final. Em vez de fazermos a titulação com o licor empírico da A. O. A. C. em que 1 ml equivale a 1 mg de P₂O₅, terminámos titulando com licor N/2. Os valores obtidos vêm diminuídos em virtude da presença do amoníaco como se vê pela reacção que se segue:



AMOSTRAS	MÉTODOS VOLUMÉTRICOS		MÉTODO GRAVIMÉTRICO DA A.O.A.C. 2.046		A.O.A.C. 2.022 (a)		Em estudo		A.O.A.C. (modificado)		Relação Ca/P	
	Valores extremos em g %		Média	Valores extremos em g %		Média	Valores extremos em g %		Média	Valores extremos em g %		
	Valores extremos em g %	Média	Valores extremos em g %	Média	Valores extremos em g %	Média	Valores extremos em g %	Média	Valores extremos em g %	Média		
Farinha de peixe I Idem com Mg (N0.) ₂	3,479 — 3,479	3,479	3,246 — 3,251	3,249	3,512 — 3,500	3,506					1,80	
	3,485 — 3,478	3,482	3,250 — 3,262	3,256	3,550 — 3,541	3,546						
Farinha de peixe II Idem com Mg (N0.) ₂	3,585 — 3,592	3,589	3,320 — 3,348	3,334	3,608 — 3,598	3,603					1,74	
	3,603 — 3,585	3,594			3,610 — 3,640	3,625						
Fórmula n.º 100 Idem com Mg (N0.) ₂	1,012 — 1,010	1,011	0,905 — 0,908	0,907	1,018 — 1,015	1,017					1,53	
	1,016 — 1,013	1,014	0,905 — 0,906	0,906	1,016 — 1,017	1,017						
Fórmula n.º 107 Idem com Mg (N0.) ₂	1,000 — 1,007	1,004	0,869 — 0,864	0,867	1,016 — 1,007	1,012					2,24	
Fórmula n.º 104 Idem com Mg (N0.) ₂	1,348 — 1,320	1,334	1,203 — 1,208	1,206	1,355 — 1,348	1,352					2,00	
	1,324 — 1,336	1,330			1,350 — 1,348	1,349						
Fórmula n.º 102 Idem com Mg (N0.) ₂	1,007 — 1,010	1,009			1,007 — 1,001	1,004					1,43	
	1,002 — 1,007	1,005			1,007 — 1,000	1,004					0,983 0,985	
Fórmula n.º 202 Idem com Mg (N0.) ₂	1,016 — 1,028	1,022			1,030 — 1,025	1,028					1,025	
	1,020 — 1,033	1,026			1,030 — 1,032	1,031					1,025 1,030 1,037	

Quantidade de algarismos	0,000	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Idem com Mg (N0 ₂):	0,710 — 0,698	0,702						0,673 — 0,679	0,676	0,673 — 0,673	0,673
Rolão de centeio	0,732 — 0,722	0,727						0,727 — 0,727	0,727	0,715 — 0,727	0,721
Idem com Mg (N0 ₂):	0,757 — 0,724	0,761						0,745 — 0,751	0,748	0,745 — 0,732	0,738
Bagaço de amendoim	0,650 — 0,658	0,654						0,661 — 0,661	0,661	0,649 — 0,643	0,646
Idem com Mg (N0 ₂):								0,679 — 0,673	0,676	0,661 — 0,655	0,658
Bagaço de coco	0,479 — 0,460	0,471						0,471 — 0,477	0,474	0,459 — 0,465	0,462
Idem com Mg (N0 ₂):								0,483 — 0,488	0,486	0,471 — 0,471	0,471
Far. de tomate extract.	1,092 — 1,074	1,083						1,090 — 1,080	1,085	1,080 — 1,080	1,080
Idem com Mg (N0 ₂):								1,102 — 1,100	1,101	1,090 — 1,100	1,095
Sêmea de trigo	1,117 — 1,124	1,121						1,126 — 1,120	1,123	1,118 — 1,120	1,119
Idem com Mg (N0 ₂):								1,132 — 1,126	1,129	1,126 — 1,120	1,123
Gérmen de arroz	1,526 — 1,540	1,533						1,542 — 1,537	1,540	1,531 — 1,537	1,534
Idem com Mg (N0 ₂):								1,549 — 1,549	1,549	1,549 — 1,542	1,546
Bagaço de palmiste	0,619 — 0,625	0,622						0,619 — 0,631	0,625	0,619 — 0,626	0,623
Idem com Mg (N0 ₂):								0,637 — 0,643	0,640	0,626 — 0,637	0,632
Solução de (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,19820	0,1986						0,20194	0,2001	0,19896	0,199
a 0,2 g% de P	0,19899	0,1798	0,1798	0,1793	0,1793	0,1793	0,19956	0,19896	0,19956	0,19837	

Nota: Nos serviços oficiais de fiscalização os resultados, referentes ao fósforo, apresentam-se por números com dois algarismos na parte decimal (3).

Isto levou-nos a fazer a adição de formaldeído, tal como procedíamos no método volumétrico em estudo. O formol combinando-se com o amoníaco para dar hexametilentetramina impede a sua interferência na titulação.

Os resultados passaram a ser comparados com os obtidos por outros métodos, podendo considerar-se francamente satisfatórios. A fim de tornar a técnica de mais fácil execução, fizemos algumas modificações e estabelecemos o modo operatório que expomos.

Reagentes:

Solução de nitromolibdato de amónio, inscrita em 2.017 dos métodos oficiais da A. O. A. C., sem ulterior adição de HNO₃.

Os outros reagentes são os já mencionados para o método que nos propuemos estudar.

Determinação:

Para um copo de 250 ml, medir 50 ml de solução das cinzas, juntar 25 ml de solução de nitrato de amónio a 50%, 25 ml de água e duas gotas de azul de bromotimol. Neutralizar com amónia (1+4), aquecer a 30° C, adicionar 25 a 35 ml de solução de nitromolibdato de amónio e agitar com agitador eléctrico, durante 30 minutos. Filtrar por papel de 11 cm, Whatman n.º 30, ou por celulose, como foi referido no método anterior, resultando do emprego desta uma economia de meia hora, pelo menos.

Dissolver em 25 a 50 ml de soda N/2, juntar formol e titular com HCl N/2 em presença da fenolftaleína.

Pode também utilizar-se um matrás de 300 ml e fazer a agitação manual, mantendo o contacto dos reagentes, durante 20 minutos.

As tomas de ensaio utilizadas foram de 10 ml para a solução de cinzas de farinha de peixe, 25 ml para as rações que tinham mais de 1,5 g % de P e 50 ml para as que tinham menos.

CONCLUSÕES

Da observação do quadro em que se apresentam os resultados analíticos dos doseamentos feitos sobre alimentos para animais e matérias primas que entram na sua preparação, pode concluir-se:

- 1) Que, na maior parte dos casos, a mineralização destes produtos, quando se tem em vista a determinação quantitativa do fósforo total, pode ser feita sem a presença de adjuvante, principalmente quando a relação Ca/P é superior a 1;
- 2) Que o método por nós estudado para o doseamento do fósforo permite obter valores muito próximos dos conseguidos com o método gravimétrico da A. O. A. C., podendo considerar-se suficientemente rigoroso para a análise de rotina, além de ser mais rápido e de fácil execução;
- 3) A filtração pelo processo que introduzimos torna possível a determinação analítica em série com grande economia de tempo.

SUMMARY

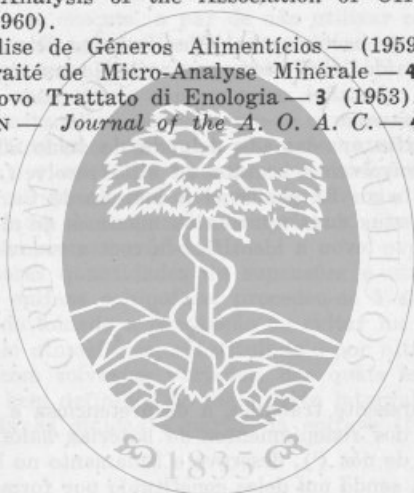
It was studied the adaptation of the volumetric method of the «International Convention of the Analytical Methods and Valuation of Wines» to the dosage of phosphorus in animal rations and in the raw materials that are used to make these rations.

The method is based on the reaction of the phosphorus' precipitations as ammonium phosphomolybdate and subsequent titration with half normal HCl, after dissolving the precipitated salt in OH Na of the same titer.

In order to avoid the interference of the liberated ammoniac on the reaction with OH Na, its combination with formaldehyde is caused, leading to the formation of hexamethylenetetramine which does not interfere in the final titration.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins. C.I.U.M.A.A.V. Phosphates. — O.I.V.V.
- (²) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists — 9.^a Ed. (1960).
- (³) ISIDORO NETTO — Análise de Géneros Alimentícios — (1959).
- (⁴) CLÉMENT DUVAL — Traité de Micro-Analyse Minérale — 4 (1956).
- (⁵) P. G. GAROGLIO — Nuovo Trattato di Enologia — 3 (1953).
- (⁶) WILLIAM M. HOFFMAN — *Journal of the A. O. A. C.* — 44 (1961).



Centro de Documentação Farmacêutica (Trabalho realizado no Instituto do Vinho do Porto) da Ordem dos Farmacêuticos

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DOS RODOPIGMENTOS DE BACTÉRIAS HALÓFILAS

ORLANDO PINTO

Lic. em Farmácia
e Assistente do Instituto Nacional
de Investigação Industrial

E. TROPA

Chefe do Grupo de Laboratórios
de Química e Biologia do Instituto Nacional
de Investigação Industrial

Os pigmentos de bactérias halófilas isoladas pelo segundo autor dum sal português foram extraídos facilmente por agitação em atmosfera de azoto com metanol, isopropanol e n-butanol, o mesmo não acontecendo com benzeno, éter de petróleo, hexano e propanona.

A cromatografia em camada delgada de ácido silícico, da clássica hipofase, usando como desenvolvente acetato de etilo resolveu três zonas distintas sendo as duas de mais baixo Rf positivas à reacção de Carr-Price.

A primeira destas duas apresentou máximos de absorção a 3.860, 4.640, 4.910 e 5.220 Å, facto que levou a identificá-la com a rodoviolascina ou espiriloxantina.

Refere-se o presente trabalho, a despretenciosa e sumária contribuição, para o estudo químico dos rodopigmentos de bactérias halófilas.

Em 1956, um de nós (1), descreve o isolamento no bacalhau português, de dois tipos de bactérias, sendo um deles constituído por formas microcócicas, gram-positivas, e outro por formas chamadas Amoebacter por Penso e das quais estuda e confirma certas propriedades bioquímicas, concluindo por verificar tratar-se duma bactéria aeróbia que não cinde sensivelmente a glucose, não produz indol e hidrogénio sulfurado, nem reduz os nitratos. É de tendência Gram-negativa.

Quanto ao pigmento, mostra-se solúvel no álcool, descora pela luz e a intensidade da sua coloração é variável.

Proseguindo os estudos referidos, procurou-se no presente trabalho, precisar a natureza química dos pigmentos dessas bacterias halófilas, isoladas dum sal marinho referenciado com o n.º 14, proveniente de Aveiro. No momento do estudo do pigmento a cultura tinha 90 dias em «gelamido».

O problema que à primeira vista parece simples pode agravar-se na medida em que as bacterias marítimas apresentam enorme multiplicidade de pigmentos dado que 50% delas são coradas (2).

Atendendo à instabilidade à luz que o pigmento em causa apresenta surgem como mais prováveis as hipóteses de se tratar de carotenoides, clorofilas ou citocromos, substâncias que pela sua natureza e propriedades se encontram intimamente ligadas à energia luminosa (3), (4), (5), (6), (7) e (8).

Impunha-se como ponto de partida, a estabilização do material a estudar por liofilização (9) e (10), técnica que infelizmente não podemos utilizar. Perante tal houve que secar a suspensão bacteriana de que se dispunha com vácuo de 1 mm Hg em banho termorregulado a +40°C.

O resíduo seco obtido, foi conservado até ser utilizado sob nitrogénio e anidrido fosfórico e na medida do possível preservado da acção da luz.

Acautelados sobre algumas dificuldades que se iriam experimentar na extracção dos pigmentos pelos solventes apolares, clàssicamente utilizada, foi-nos dado comprovar a ineficácia do benzeno, éter de petróleo e hexano.

Todavia a extracção era completa e à temperatura ambiente (cerca de +22°C), pelos álcoois alifáticos até C₄, sendo a propanona um solvente sem acção extractiva sobre os pigmentos nas mesmas condições.

Em certa medida não se esperava que tal sucedesse, pois atendendo à elevada percentagem de lípidos existentes na parede das bactérias halófilas⁽¹¹⁾, seria natural um fácil acesso aos pigmentos, uma vez solubilizados aqueles embora se verifique serem as halófilas lisadas osmoticamente com relativa facilidade⁽¹²⁾,⁽¹³⁾ e⁽¹⁴⁾.

O resíduo de extracção após uma ou duas lavagens com mais solvente, apresentava-se praticamente descorado e com o aspecto de massa branca. Pela facilidade com que tal extracção se executa, a par de não utilizar condições de certo modo drásticas como a saponificação utilizada entre outros por KARRER e TURRIAM⁽¹⁵⁾ e⁽¹⁶⁾, foi este o processo sistemáticamente escolhido para a extracção pigmentária.

Partindo dum extracto metanólico, pesquisaram-se carotenoides, (triclóreto de antimónio em clorofórmio), citocromos (pesquisa pela o-fenantrolina do ferro libertado por hidólise clorídrica) e colorofila (bandas de absorção características).

Estes ensaios falharam na quase totalidade, donde adveio a necessidade de se trabalharem maiores quantidades de suspensões bacterianas, e submeter o extracto que se obtivesse a purificação cromatográfica.

Partindo então de maiores quantidades de suspensões e utilizando a consagrada e clássica técnica de epifase e hipofase, procedeu-se à sua cromatografia sobre alumina activada, tendo tomado a precaução de evitar na medida do possível o contacto com o oxigénio atmosférico, substituindo-o por nitrogénio.

Após desenvolvimento com solventes variados, dos quais escolhemos os que originavam cromatogramas bem definidos no mais curto intervalo de tempo, procedeu-se à extrusão das colunas obtidas a partir da epifase (fig. 1) e hipofase (fig 2).

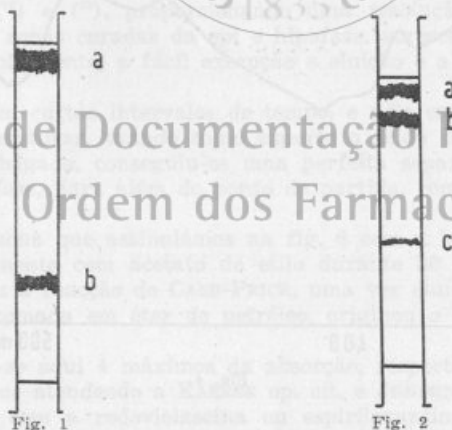


Fig. 1

Fig. 2

Eluíram-se as zonas coradas pelos pigmentos, previamente cortadas, com vários solventes e procurou-se traçar o espectro contendo máximos de absorção característicos, os quais se na região do ultra-violeta, não proporcionaram conclusões definitivas, foram muito mais esclarecedores na zona do visível.

Apresentamos os espectros na região visível das zonas a e b da epifase figs. 4 e 5 respectivamente, obtidos em hexano. Estas zonas eram positivas à reacção de CARR-PRICE.

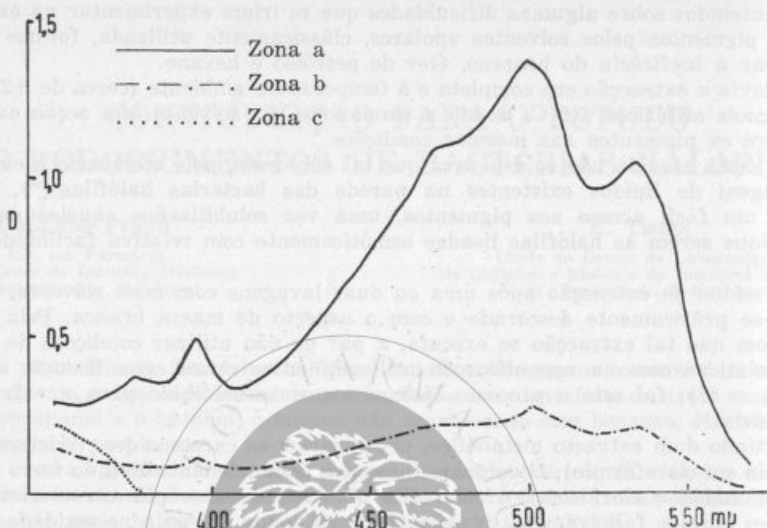


Fig. 3

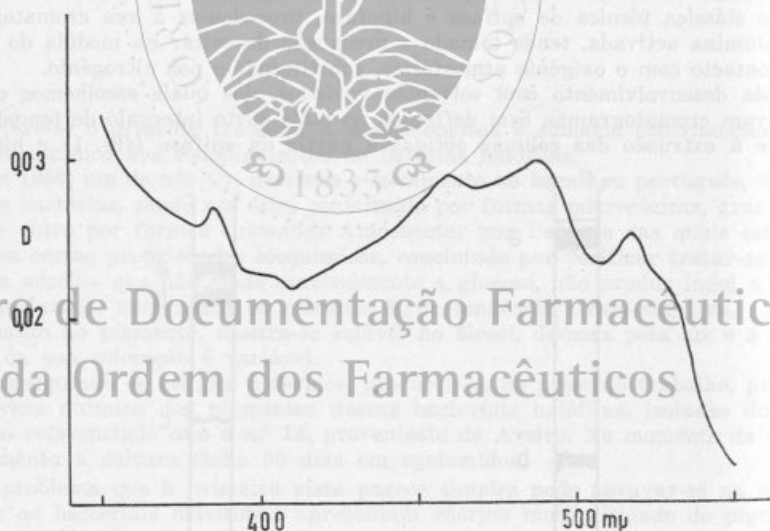


Fig. 4

Da hipofase também cromatografada em alumina fig. 2, apresentamos os espectros obtidos em clorofórmio na fig. 3, das quais as zonas *a* e *b*, eram positivas à reacção de CARR-PRICE. Se bem que na zona *a*, se observassem máximos a 375,395,500 e 535 $m\mu$ e na zona *b* desaparecesse o máximo a 375 $m\mu$, persistindo os outros, não nos foi possível identificá-los inequivocamente com os dados da literatura.

As cromatografias executadas sobre hidróxido de cálcio não resultaram nem práticas nem esclarecedoras.

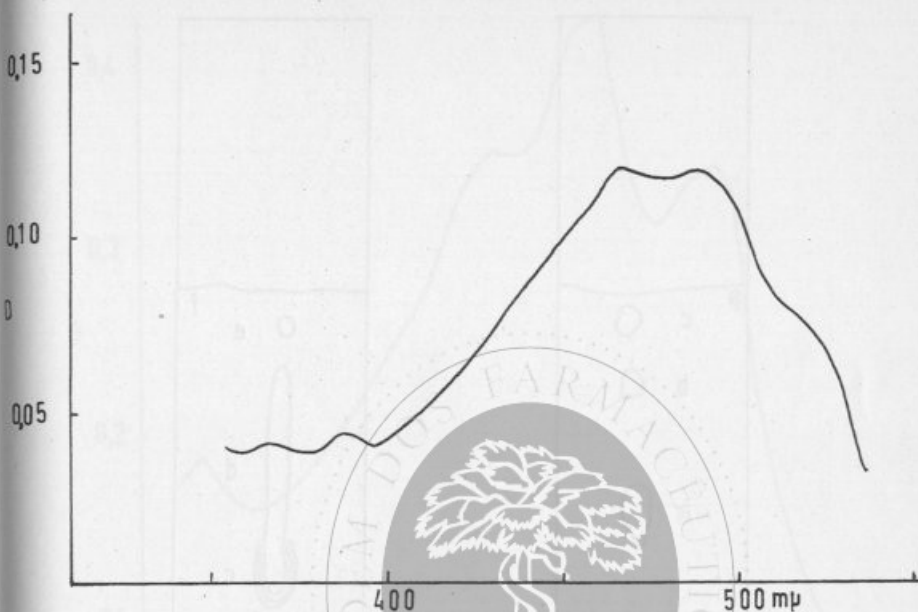


Fig. 5

Em nenhum dos espectros efectuados, foi possível, na região do visível, notar bandas de absorção características da bacterioclorofila⁽¹⁷⁾ (18), nem mesmo da clorofila dos *Chorobium*⁽¹⁹⁾.

Mostrou-se particularmente interessante a cromatografia em camada delgada sobre ácido silícico⁽²⁰⁾ e (21), proporcionando uma resolução eficaz dos constituintes das diversas zonas coradas da epi e hipofase, acrescentando-se a seu crédito a rapidez do desenvolvimento, a fácil execução e eluição e a elegância técnica de que se reveste.

Efectivamente em curtos intervalos de tempo, e pelo emprego apropriado de solventes puros ou misturas, usando como suporte o ácido silícico para cromatografia em camada delgada, conseguiu-se uma perfeita separação de 3 zonas na hipofase e 5 na epifase, para além do ponto de partida, como se pode notar nas figs. 6 e 7.

Na hipofase a zona que assinalámos na fig. 6 com a letra *a*, que se conseguiu por desenvolvimento com acetato de etilo durante 30 minutos e que como a zona *b* era positiva à reacção de CARR-PRICE, uma vez eluída com colorofórmio, eliminado este, e retomada em éter de petróleo, originou o espectro reproduzido na fig. 8.

Podem observar-se aqui 4 máximos da absorção, respectivamente a 386, 464, 491 e 522 $m\mu$, pelo que atendendo a KARRER op. cit. e JENSEN⁽²¹⁾, se pode identificar este pigmento com a rodoviolascina ou espiriloxantina, de cuja presença vínhamos já suspeitando ao elaborar-se o espectro da zona *a* da epifase, separada por cromatografia sobre coluna de alumina.

Segundo trabalhos de excepcional nível, que Synnöve Liaaen Jensen vem publicando nos anos recentes⁽²²⁾, (23), (24), (25), (26), (27) e (28) a existência de determinados carotenoides nas bacteriais, permitiram uma classificação bioquímica destes organismos.

O interesse e extraordinário alcance destes estudos não deixa margem a dúvidas particularmente se se atender à artificialidade de alguns sistemas de classi-

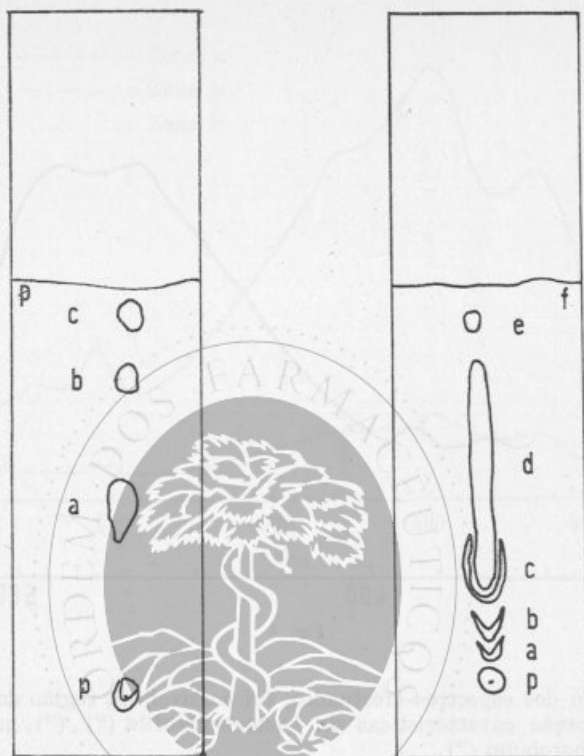


Fig. 6

Fig. 7

ficação ainda em uso, que utilizam certas diferenças às vezes de ordem secundária.

As nossas possibilidades, não permitiram de momento ir mais adiante em tão sedutor campo, e mais não pretendemos com a singeleza desta iniciação, senão contribuir um pouco para que mais venturosos esclareçam este importante capítulo da bioquímica.

PARTE EXPERIMENTAL

1 — EXTRACÇÃO DOS PIGMENTOS

a) Amostra

Erá constituída por 200 ml de uma suspensão bacteriana obtida a partir de um sal referenciado com o n.º 14, com cerca de 90 dias de cultura a temperatura ambiente, e de cor rosa.

b) Separação das bactérias

Arrefeceu-se a suspensão bacteriana a cerca de 3—4°C, e centrifugou-se por 15 minutos a cerca de 4.000 r.p.m. em centrifuga ECCO Tipo E II/11, utilizando tubos de vidro Pyrex de 50 ml de capacidade, devidamente rolhados e após ter substituído o ar por nitrogénio.

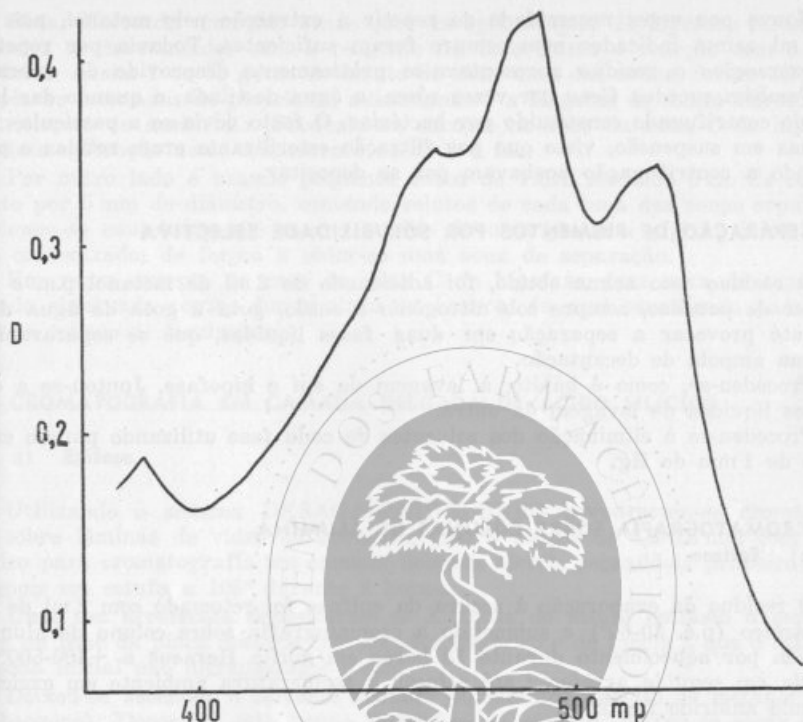


Fig. 8

O resíduo foi adicionado de 30 ml de água destilada arrefecida, substituindo o ar por nitrogénio como anteriormente, agitando-se então em aparelho Griffin & George, bem rolhado o tubo e durante 15 minutos. Centrifugou-se durante 15 minutos.

Repetiu-se do mesmo modo a lavagem com novos 30 ml de água arrefecida, evitando a acção directa da luz solar.

c) Solubilização dos pigmentos

O resíduo de lavagem foi adicionado em cada tubo de 30 ml de metanol p., a Merck e cerca de 5 gr de esferas de vidro Pyrex com cerca de 4 mm de diâmetro. Depois de substituir o ar do tubo por nitrogénio e rolar convenientemente, foram as bacterias agitadas em agitador Griffin & George, à velocidade máxima.

Manteve-se a agitação por 90 minutos, centrifugou-se durante 15 minutos. Decantou-se o líquido extractivo sobrenadante, corado de roseo-avermelhado. Lavou-se o resíduo por mais duas vezes com 15 cm³ de cada vez, de metanol p.a., tendo sempre a precaução de evitar contactos prolongados com o ar e a luz. Reuniram-se os líquidos de lavagem com o extractivo.

d) Eliminação do solvente

O metanol foi evaporado sob vácuo evaporador rotativo W. BÜCHI, a temperatura ambiente, até obtenção de resíduo sêco.

Houve por vezes necessidade de repetir a extracção pelo metanol, pois que os 30 ml acima indicados nem sempre foram suficientes. Todavia por repetição das extracções o resíduo apresentava-se praticamente desprovido de coloração.

Também sucedeu ficar por vezes rósea, a água destilada, a quando das lavagens do centrifugado constituído por bactérias. O facto devia-se a partículas bacterianas em suspensão, visto que por filtração esterilizante eram retidas e prosseguindo a centrifugação acabavam por se depositar.

2 — SEPARAÇÃO DE PIGMENTOS POR SOLUBILIDADE SELECTIVA

O resíduo seco acima obtido, foi adicionado de 2 ml de metanol p.a. e 2 ml de éter de petróleo, sempre sob nitrogénio e então, gota a gota de água destilada até provocar a separação em duas fases líquidas, que se separaram em pequena ampola de decantação.

Procedeu-se, como é hábito, à lavagem da epi e hipofase. Juntou-se a cada uma os líquidos de lavagem da outra.

Procedeu-se à eliminação dos solventes de cada fase utilizando para o efeito vácuo de 1 mm de Hg.

3 — CROMATOGRAFIA SOBRE COLUNAS DE ALUMINA

a) Epifase

O resíduo da evaporação à secura da epifase foi retomado com 2 ml de éter de petróleo (p.e. 30-60°) e submetido a cromatografia sobre coluna de alumina, activada por aquecimento durante 18 horas em mufla Heraeus a +400-500°C, e deixada em seguida arrefecer até atingir a temperatura ambiente em excitador contendo anidrido fosfórico.

A coluna média cerca de 10 cm de altura por 10 mm de diâmetro, havia sido previamente impregnada com éter de petróleo.

O desenvolvimento processou-se utilizando 30 ml de mistura em partes iguais de éter de petróleo e clorofórmio (tendo em vista um rápido desenvolvimento e porque a instabilidade da substância não aconselhava a clássica cromatografia líquida com adição de quantidades crescentes de solventes de poder de eluição superior e de acordo com as usuais escalas eluotrópicas), e operando sempre sob nitrogénio.

Extraíu-se a coluna de alumina, cortaram-se as duas zonas que se separaram, e eluiu-se cada uma delas, com 5 ml de clorofórmio, lavando com sucessivas porções do mesmo solvente até descolação total. Os eluatos foram evaporados à secura no vácuo (5 mm Hg). O resíduo foi então retomado com 10 ml de Hexano BDH e determinaram-se as densidades ópticas, utilizando para o efeito, espectrofotómetro SP 500.

Nas figs. 4 e 5 apresentam-se os espectros obtidos com as zonas *a* e *b*, esquematisadas na fig. 1.

b) Hipofase

O resíduo da evaporação à secura da hipofase foi retomado com 5 ml de clorofórmio e submetido a cromatografia sobre coluna de alumina de modo idêntico ao seguido para a epifase. Separaram-se 3 zonas que assinalamos na fig. 2.

Extruída a coluna isolaram-se por cortes as zonas separadas e eluíram-se com porções de 5 ml de clorofórmio.

Executou-se para cada uma das zonas o espectro em aparelho Uncam SP 500, utilizando para o efeito o eluato clorofórmico.

As absorções lidas determinaram o espectro representado na fig. 3.

Nota: Em cada uma das zonas quer da epifase quer da hipofase foram pesquisados os carotenóides com o reagente de CARR-PRICE e reacção com o ácido sulfúrico. Assim I ou II gotas do eluato de cada uma das zonas, foram colocadas em placas escavadas de porcelana, adicionando I a II gotas de soluto clorofórmico de tricloreto de antimónio. Produziu-se, excepto no caso da zona C da hipofase, imediata coloração azul, evanescente ao ar e à luz.

Por outro lado e usando pequenos tubos de vidro medindo 5 cm de comprimento por 5 mm de diâmetro, contendo solutos de cada uma das zonas separadas, adicionou-se cuidadosamente com o auxílio de uma pequena pipeta, ácido sulfúrico concentrado, de forma a obter-se uma zona de separação.

Em regra excepto no caso da zona C da hipofase, essa zona de separação quando observada contra fundo claro ou branco, de azul esverdeado passava a azul no espaço de 5 minutos.

4 — CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ÁCIDO SILÍCIO

a) Epifase

Utilizando o sistema DESAGA-HEIDELBERG prepararam-se cromatoplas sobre lâminas de vidro de 20x5 cm, com a altura de 0,2-0,3 mm com ácido silício para cromatografia em camada delgada Merck, secando-as primeiro ao ar e depois em estufa a 105° durante 2 horas.

Uma vez arrefecida depositaram-se X gotas de soluto epifásio a cerca de 2 cm da base da placa secando com secador eléctrico e de forma a que o diâmetro da zona inicial não ultrapassasse 8 mm.

Deixou-se ascender o solvente durante 30 minutos (Solutos de metanol a 5% em benzeno). Decorrido este tempo retirou-se da câmara, deixou-se secar ao ar. Separaram-se 5 zonas, sendo as duas com maior R_F fluorescentes aos RUV. (fig. 7).

b) Hipofase

Usando a mesma técnica mas como solvente o acetato de etilo separaram-se 3 zonas a partir do ponto inicial (fig. 6) onde *a* e *b* apresentavam reacção de CARR-PRICE positiva.

Eluída após separação a zona *a* com éter de petróleo e lendo as absorções em espectrofotómetro SP 500, resolvendo-se máximos a 386, 464, 491 e 522 m μ ; podemos igualmente observar que em leituras executadas com poucos minutos de intervalo as densidades ópticas diminuam rapidamente, embora persistissem os mesmos máximos.

CONCLUSÕES

- 1) — Extrairam-se os rodopigmentos de bactérias halófilas isoladas de um sal referenciado com o n.º14, por agitação com bolas de vidro, durante 90 minutos, sob nitrogénio e a temperatura ambiente, com álcoois ali-fáticos até C₄.
- 2) — Nas mesmas condições não resultou a extracção com benzeno, éter de petróleo, hexano e propanona.
- 3) — Dividido o extracto dos rodopigmentos em hipofase e epifase separaram-se 3 zonas a partir da primeira e duas da segunda fase por cromatografia através de coluna de alumina activada.
- 4) — Não foi possível identificar nas condições descritas atraz citocromos e bacterioclorófilas.

- 5) — As zonas separadas por cromatografia em coluna de alumina são com excepção duma, positivas à Reacção de CARR-PRICE e do ácido sulfúrico. (Carotenoides).
- 6) — A cromatografia em camada delgada de ácido silícico é um processo eficiente e rápido, separando 5 zonas na epifase e 3 na hipofase.
- 7) — A zona denominada *a*, obtida por cromatografia em camada delgada a partir da hipofase, apresenta máximos de absorção que nos levam a identificá-la com a rodoviolascina ou espiriloxantina.

SUMMARY

The halophyle bacteria isolated by the second author from a portuguese salt, gave pigments which were easily extracted by shaking on a nitrogen atmosphere added with methanol, isopropanol and n-butanol, and the same did not happen with benzene, petroleum ether, hexane and propanone.

The silicic acid thin layer chromatography, of the classic hipophase using as developer ethylacetate resolved three different zones, the two of them with lower Rf being positive to the Carr-Price reaction.

The first of these two present absorptions maximums at 3860, 4640, 4910 and 5220 Å, fact that allowed to identify it with the rodoviolascine or spirilloxanthin.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TROPA, E. e GALAMBA, A. — Bactérias halófilas do vermelho do bacalhau. Lisboa — 1956.
- (2) BOISON, J. — *Microb. Mil. Marin*, Paris, 1955.
- (3) GOODWIN, T. W. — *An. Rev. Bioch.*, **24**, 497 (1955).
- (4) BORMER, J. et al. — *Arch. Bioch.*, **10**, 113 (1946).
- (5) LAMBRECH, R. e FISHER, H. — *Z. Physiol. Chem.*, **1**, 249 (1937).
- (6) Idem, **1**, 253 (1938).
- (7) WEIG, J. W. — *Journ. Am. Chem. Soc.*, **75**, 999 (1953).
- (8) SEYBOLD, A. e HIRCH, G. — *Naturwissech.*, **41**, 258 (1954).
- (9) FLOSDORFF, E. W. — *Freeze Drying* — Nova Iorque, 1949.
- (10) REY, L. — *Traité de Liophylisation*, Paris, 1960.
- (11) SMITHIES et al. — *Journ. Biol. Chem.*, **1**, 605, (1955).
- (12) SALTON, M. R. J. — *Bacterial Cell Wall*, Nova Iorque, 1960.
- (13) TAKASCHI, I. e GIBBONS, N. E., *Can. Journ. Microb.*, **3**, 687 (1957).
- (14) SMITHIES, W. R.; GIBBONS, N. E.; BAYLEY, S. T., *Can Journ. Microb.*, **1**, 605, (1955).
- (15) KARRER, P. e JUCKER, E., *Carotenoids*, Nova Iorque, 1950.
- (16) TURIAM, G. — *Helvetica Chim. Acta*, **36**, 937. (1953).
- (17) SMITH, J. H. e BENITEZ, A. — *Modern Methoden der Pflanzen Analyse*, Berlin, Vol. IV, 177.
- (18) SKERMAN, V. B. D. — *A guide to identification of the genera of bacteria*.
- (19) HOLT, A. S. e MORLEY, H. V. — *Journ. Am. Che. Soc.*, **82**, 500 (1960).
- (20) STAHL, E. — *Pharmazie*, **11**, 6333. (1956).
- (21) STAHL, E. — *Chemiker Zeitung*, **10**, 323. (1958).
- (22) JENSEN, S. L. et al. — *Bioch. Biophys. Acta*, **29**, 477. (1958).
- (23) JENSEN, S. L. — *Acta Chem. Scand.*, **13**, 2143. 1959).
- (24) JENSEN, S. L. — *Acta Chem. Scand.*, **13**, 381 (1959).
- (25) JENSEN, S. L. — *Acta Chem. Scand.*, **13**, 842. (1959).
- (26) JENSEN, S. L. — *Acta Chem. Scand.*, **14**, 482. (1960).
- (27) JENSEN, S. L. — *Acta Chem. Scand.*, **15**, 181. (1961).
- (28) JENSEN, S. L. — *Nature*, 1171. (1961).

(Trabalho efectuado no INII)