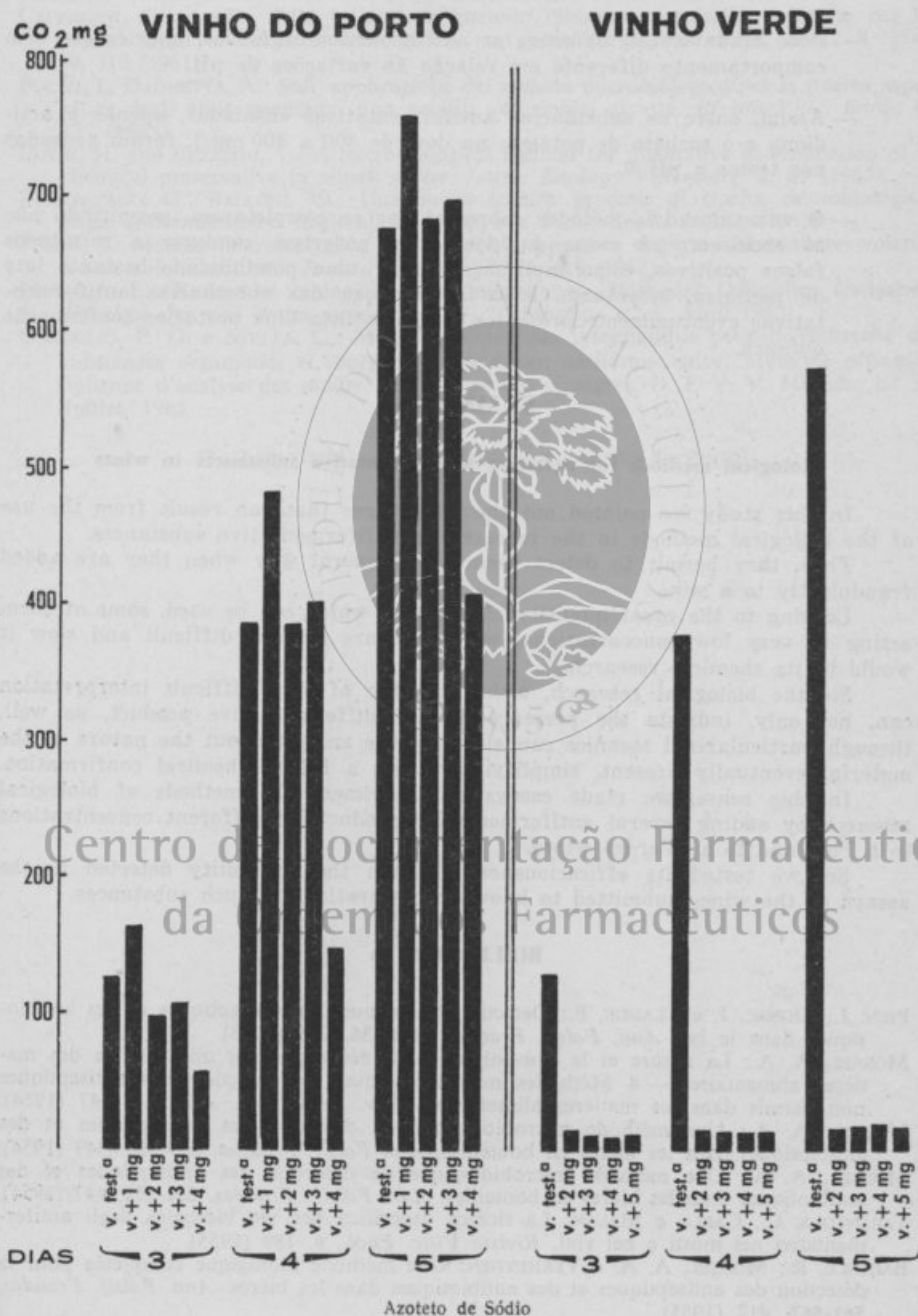


1 — MÉTODO OFICIAL FRANCÊS DE REFERÊNCIA



- O M. O. I. revela-se com interesse, principalmente por apresentar técnicas especializadas e diferentes para pesquisar quer os antifermentos orgânicos, quer os antifermentos inorgânicos, orgânicos termoestáveis e voláteis em meio ácido.
- Pode ainda distinguir entre os antifermentos orgânicos, aqueles que têm comportamento diferente em relação às variações de pH.
- Assim, entre as substâncias antifermentativas ensaiadas, apenas a actidiona e o sorbato de potássio na dose de 300 a 400 mg/l, foram acusadas nos testes a pH 6.
- O valor dos dois métodos sobressai por se completarem, permitindo não só esclarecer os casos duvidosos que poderiam conduzir a resultados falsos positivos, como também, fornecer uma possibilidade bastante lata de pesquisa, orientando sobre a natureza das substâncias antifermentativas eventualmente presentes, o que facilita uma posterior confirmação química.

SUMMARY

Biological methods for detecting antifermentative substances in wines

In this study we pointed out the advantages that can result from the use of the biological methods in the research of antifermentative substances.

Thus, they permit to detect them in a general way when they are added fraudulently to a wine.

Looking to the great quantity of products which can be used, some of them acting in very low concentrations, we are aware of how difficult and slow it would be its chemical research.

So, the biological research, although often of very difficult interpretation can, not only, indicate the presence of an antifermentative product, as well, through particularized technics can elucidate the analyst about the nature of the material eventually present, simplifying widely a future chemical confirmation.

In this sense, we made essays to experiment the methods of biological research by adding several antifermentative products in different concentrations to a Port and to a «Verde» wines.

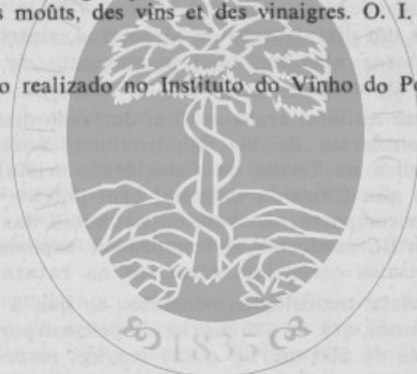
So, we tested its efficaciousness through the sensibility detected in the assays of the wines submitted to known concentrations of such substances.

BIBLIOGRAFIA

- PIEN, J.; LIGNAC, J. e CLAUDE, P.: Detection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait *Ann. Falsif. Fraudes*, 535-536, 258 (1953).
- MOSSSEL, A. A.: La nature et la prévention de la décomposition microbienne des matières alimentaires. — 4 Méthodes microbiologiques de détection des antiseptiques non permis dans les matières alimentaires. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 4, 147 (1954).
- MOSSSEL, A. A.: Une méthode microbiologique de détection des antiseptiques et des antibiotiques dans les bières en bouteilles, *Ann Falsif. Fraudes*, 549-550, 349 (1954).
- MOSSSEL, A. A.: Une méthode microbiologique de détection des antiseptiques et des antibiotiques dans les bières en bouteilles. *Ann. Falsif., Fraudes*, 551-552, 447 (1954).
- TARANTOLA, C., CARLO e MALAN: La ricerca aspecifica per via biologica degli antifermentativi nei mosti e nei vini. *Rivista Vitic. Enol.*, 6, 189 (1955).
- BAETSLÉ, R.; MOSSSEL, A. A. e VERHEYDEN: Une méthode biologique complétée pour la détection des antiseptiques et des antibiotiques dans les bières. *Ann. Falsif. Fraudes*, 561-562, 412 (1955).

- PIEN, J.: Identification biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans certaines denrées alimentaires. Emploi de souches résistantes lyophilisées. *Ann. Falsif. Fraudes*, **600**, 409 (1958).
- RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, E.: Analyse et contrôle des vins, 2.^a ed., Paris, 1958.
- RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, E.: *Traité d'Oenologie*, Paris, 1960 (I-B).
- CAPPELESI, G.: Analisi della validità del metodo biologico sistematico ufficiale per la ricerca degli antifermentativi organici non permessi. *Rivista Vitic. Enol.*, **8**, 274; **9**, 312 (1961).
- POLITI, I., DAGHETTA, A.: Sull' applicazione del metodo microbiologico per la ricerca aspecifica degli antifermentativi non volatili addizionati ai vini. *Rivista Vitic. Enol.*, **4**, 137 (1963).
- LUTHI, H. and BEZZEGH, T.: A microbiological method for qualitative determination of a chemical preservative in wines. *Amer. Journ. Enology Viticulture*, **2**, 61 (1963).
- FLORENZANO, G., BALLONI, W.: Una nuova tecnica generale di ricerca microbiologica degli antifermentativi negli alimenti. *Rivista Vitic. Enol.*, **8**, 281 (1963).
- POLITI, I.: Metodo microbiologico per la ricerca aspecifica degli antifermentativi volatili e non volatili nei vini. *Rivista Vitic. Enol.*, **11**, 417 (1963).
- PEYNAUD, E.: Recherche biologique des antiseptiques. *Méthodes Officielles françaises d'analyse des vins et des moûts*. O. I. V. V. Microb., n.º 1, Abril 1965.
- GAROGLIO, P. G. e STELLA, C.: Méthode biologique systematique pour la recherche de substances organiques et inorganiques à action antifermentative. Méthode officielle italienne d'analyse des moûts, des vins et des vinaigres. O. I. V. V. Microb., n.º 3, Juillet, 1965.

(Trabalho realizado no Instituto do Vinho do Porto)



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

ESTUDO ANALÍTICO DO CLORIDRATO DE PIRITIOXINA (*)

GERARDO MATTA

E. SIMÕES LOPES

Químicos-Farmacêuticos

A piritioxina é um dissulfureto de piridoxina, sintetizado e investigado originariamente por autores alemães do Departamento de Pesquisas de E. Merck (Darmstadt) sob as siglas 36—II e 685.

Do ponto de vista químico trata-se dum derivado dissulfurado da vitamina B₆, precisamente o dissulfureto de bis 3-hidroxi metil-2-metilpiridol-(5)-metil, composto usado em Clínica na forma de dicloridrato cristalizado com uma molécula de água. Apesar da sua filogenia química, bem patente na fórmula de estrutura adiante publicada, o composto não revelou nenhuma das acções vitamínicas específicas da vitamina B₆, conforme se comprovou experimentalmente por métodos microbiológicos e ensaios carenciais curativos na ratazana.

Do ponto de vista toxicológico constatou-se que a DL 50 da piritioxina no rato, por via endovenosa, era de 225 mg/kg de peso corporal; na ratazana e no gato registaram-se valores de 500 mg/kg e 124 mg/kg, respectivamente. Pela via subcutânea, a DL 50 no rato é de 3,17 g/kg e na ratazana, de 3 g/kg, valores que se elevam respectivamente para 6, 14 g/kg e 6 g/kg quando a droga é administrada pela via oral. Como se vê, as doses tóxicas de piritioxina são relativamente elevadas e excedem bastante as posologias terapêuticas activas, a que confere ao fármaco, uma margem de segurança notável na prática clínica.

Investigadores do Departamento Farmacológico dos Laboratórios de Pesquisas da E. Merck (Darmstadt), procederam a diversos estudos experimentais em animais de laboratório, orientados no sentido de averiguar a acção da piritioxina sobre o sistema nervoso central. De uma maneira geral foi possível demonstrar um efeito calmante em experiências realizadas sobre várias espécies animais. No gato, sujeito a administração prévia duma dose de 150 mg/kg de piritioxina, os investigadores constataram um efeito tranquilizante que perdurou por vezes durante 28 horas. Noutras experiências em que foi utilizada a ratazana como animal de experiência, a prova do salto com concomitante análise do comportamento do animal não levou a resultados idênticos, não tendo sido observada

(*) Produto químico de síntese patenteado por E. Merck (Darmstadt) e especializado por esta firma sob a marca de fábrica Bonifen.

qualquer acção tranquilizante. No coelho, verificou-se uma acção discreta, mais do tipo analgésico-central do que do tipo tranquilizante.

Como anti-convulsivo, a droga não exerceu qualquer acção nas convulsões provocadas na ratazana pelo pentametilenotetrazol ou pelo cloridrato de cocaína. Contudo, quando os animais eram previamente medicados com tio-semicarbazida, conseguia constatar-se algum efeito anti-convulsivo, nas contracções induzidas pela cocaína. A piritioxina produziu portanto efeito anti-convulsivo, apenas na presença de dismetabolia cerebral.

Na anestesia geral pelo hexabarbital sódico, na ratazana, a piritioxina prolongou a fase da excitação.

De uma forma geral, nos diversos ensaios realizados, os AA. observaram, conforme o método de ensaio utilizado, uma acção tranquilizante ou sedativa ou, então, um efeito excitante central.

No decurso do estudo farmacológico inicial do fármaco, levado a cabo pelos investigadores da E. Merck (Darmstadt), foram também investigados os efeitos da piritioxina sobre o aparelho circulatório e a respiração. Os autores constataram que a piritioxina, administrada em doses terapêuticas, não exercia qualquer influência na frequência respiratória, tensão arterial e frequência do pulso.

QUADBECK, LANDMANN, SACHSE e SCHMIT, da Clínica Neurológica da Universidade de Homburg, em artigo publicado na revista *Medicina Experimentalis*, deram conta dos seus estudos experimentais acerca do transporte de fosfato, sódio e glucose através da barreira hematoencefálica, sob a influência da piritioxina, piridoxina, piridoxal e desoxipiridoxina. A piritioxina, na dose de 200 mg/kg, reduziu o transporte de fosfato, aumentando por outro lado o de sódio. Demonstrou-se igualmente o aumento de transporte de glucose através da barreira hematoencefálica, aumento que se manteve especialmente marcado mesmo depois de terminar a terapêutica. Simultaneamente os autores comprovaram um aumento de actividade cerebral.

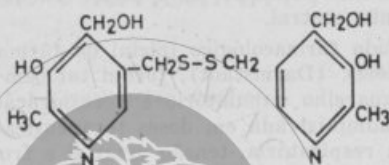
Outras investigações permitiram comprovar a influência da piritioxina na assimilação do C¹⁴, procedente da glucose sanguínea, na fracção lipídica do encéfalo. O aumento do transporte de sódio através da barreira hematoencefálica sob a influência da piritioxina permitiu concluir que a droga possui uma acção estimulante central, diminuindo o transporte de fosfatos do sangue para o sistema nervoso central e aumentando, por outro lado, o transporte de glucose e sódio no cérebro.

O efeito impermeabilizante da piritioxina sobre o transporte fosfático, permite considerar o emprego terapêutico do composto em situações em que como consequência de perturbação da nutrição cerebral, resulta a falência da barreira como acontece após traumatismos crâneo-encefálicos, ataques apopléticos e intoxicações com lesões centrais. Como no edema cerebral traumático se observa um acréscimo absoluto de água, sódio e potássio no tecido cerebral, traduzindo uma perturbação reversível do metabolismo com falência subsequente do transporte activo na membrana artrocítica, a piritioxina reveste-se neste caso dum interesse particular, visto influenciar o metabolismo cerebral no sentido da sua normalização.

Por outro lado, a activação metabólica sugerida pelo comportamento do transporte sódio-glucídico, deve ter significado particular no emprego da piritioxina em geriatria.

Uma extensa documentação clínica comprova hoje o valor terapêutico da piritioxina, particularmente no domínio da neuropsiquiatria e da geriatria, confirmando no plano terapêutico os dados farmacológicos acabados de resumir e deixando prever resultados promissores num campo particularmente difícil da terapêutica clínica.

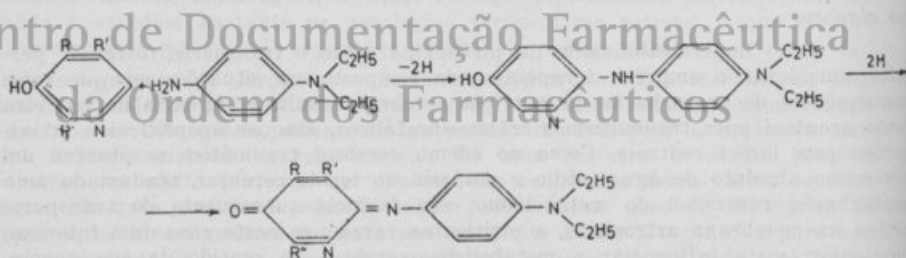
Do ponto de vista analítico, o dicloridrato de piritioxina apresenta-se como um pó branco, cristalino, de sabor amargo e salino, sem cheiro apreciável, solúvel na água, menos no álcool e muito pouco nos solventes orgânicos vulgares. A sua fórmula bruta é: $C_{16}H_{20}O_2N_2S_2 \cdot 2ClH, OH_2$, correspondendo-lhe a seguinte estrutura química:



O simples exame desta fórmula de estrutura sugere à priori alguns métodos clássicos de análise funcional e instrumental para identificação e doseamento da droga: espectros I.V. e U.V. e reacções funcionais características dos grupos fenol, álcool primário e dissulfureto.

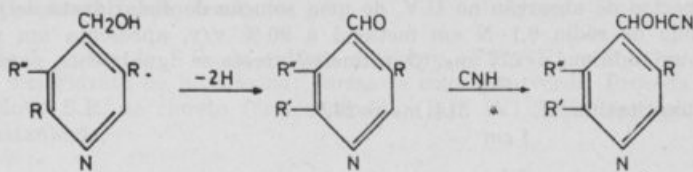
A função fenol da piritioxina pode pôr-se em evidência pela formação de complexos corados com os iões cúprico e férrico, devidos a ligações de hidrogénio. Também pode identificar-se pela formação de um composto corado indofenólico por reacção com o cloridrato de N,N dietil p-fenilendiamina, em presença do ferricianeto de potássio.

Esta última reacção pode representar-se pelo esquema seguinte:



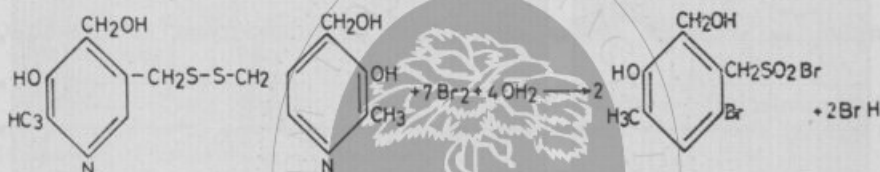
Adicionalmente, o ferricianeto oxida também a função dissulfureto a ácido sulfónico, reacção que pode aproveitar-se para análise quantitativa.

A função álcool da piritioxina põe-se em evidência pela fluorescência característica da cianidrina do aldeído correspondente. Este aldeído obtém-se por oxidação suave da droga pelo bióxido de manganés. A equação que traduz o fenómeno é a seguinte:



Todavia, o processo não é quantitativo devido à oxidação parcial da função dissulfureto.

Por último, a função dissulfureto pode ser titulada com bromo, formando-se duas moléculas do ácido sulfónico correspondente. O facto de se encontrar livre a posição *para* em relação ao grupo fenólico, possibilita igualmente a bromação da molécula:



O estudo destas reacções funcionais permitiu-nos estabelecer os métodos de identificação e de doseamento da piritioxina que apresentamos a seguir.

PARTE EXPERIMENTAL

1. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

O ponto de fusão da base e o estudo dos espectros no I.V. e no U.V. foram escolhidos como critérios básicos de pureza e identificação da piritioxina. A identificação dos grupos funcionais fenólico e alcoólico, completa os dados físicos de identificação da droga.

a) Ponto de fusão

Neutralize até pH=7 um soluto a 10 % de dicloridrato de piritioxina. Filtre e lave os cristais formados, primeiro com água fria e depois com metanol. Seque a 50° no vácuo, em presença de anidrido fosfórico, até peso constante. Ponto de fusão da piritioxina base: 219,5°-220,5° C (tubo capilar).

b) Espectro no U. V.

O espectro de absorção no U.V. de uma solução de dicloridrato de piritioxina em ácido clorídrico 0,1 N apresenta um máximo a 296 m μ e um mínimo a 260 m μ . O primeiro é adequado para a determinação quantitativa: E = $\frac{296 \text{ m}\mu}{1 \text{ cm}}$ = 378.

O espectro de absorção no U.V. de uma solução de dicloridrato de piritioxina em hidróxido de sódio 0,1 N em metanol a 90 % v/v, apresenta um máximo a 314 $m\mu$ e um mínimo a 277 $m\mu$. O primeiro presta-se igualmente para a determinação quantitativa: $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 24,5$.

c) Espectro no I. V.

Os espectros de absorção no I.V. de pastas feitas com nujol e hexaclorobutadieno de dicloridrato de piritioxina pura e seca constam das Figs. 1 e 2.

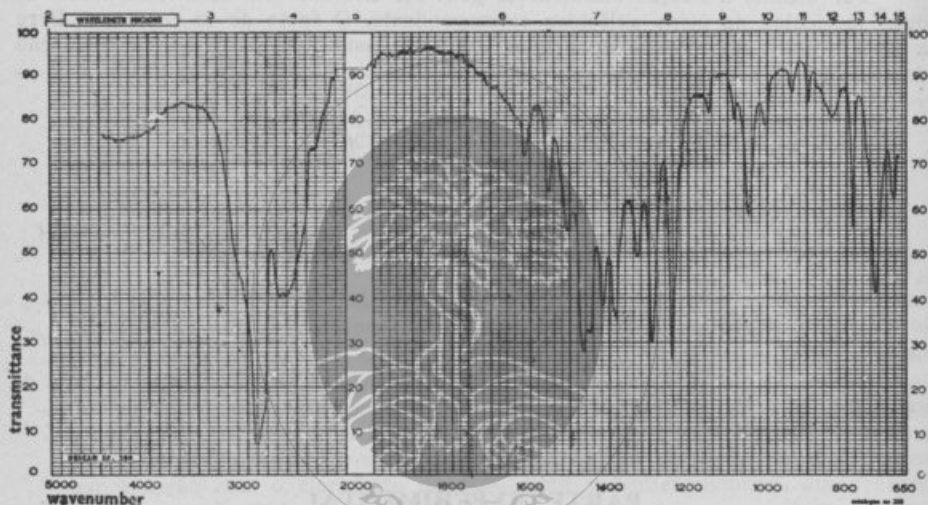


Fig. 1 - Piritioxina (Mull de Nujol)

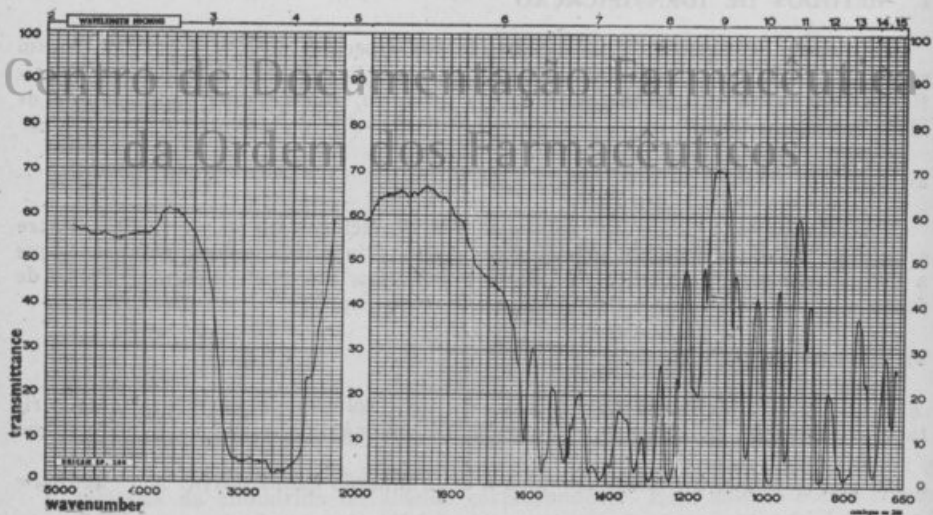


Fig. 2 - Piritioxina (Mull - HCBD)

d) Identificação da função fenol

Junte V gotas de S.R. de sulfato de cobre (F.P. IV) a 2 cc de um soluto a 1 % de dicloridrato de piritioxina: forma-se coloração verde. Proceda da mesma forma usando S.R. de cloreto férrico diluído (F.P. IV): forma-se coloração vermelho-acastanhada.

e) Identificação da função álcool

A 3 ml de uma solução de dicloridrato de piritioxina a 100 γ /ml junte 0,2 g de bióxido de manganés e agite 10 m. Filtre, junte 10 ml de fosfato de potássio M e acerte a pH = 7,4 com ácido clorídrico N. Junte 2 ml de soluto de cianeto de potássio a 0,4 % e mantenha por 15 m em banho de vapor. Acerte a pH = 9,5 com amónia a 6 M e observe sob luz U.V. $\lambda = 365 \text{ m}\mu$. Aparece uma fluorescência verde.

2. MÉTODOS DE DOSEAMENTO

a) Doseamento microanalítico do enxôfre pelo método do matrás de oxigénio de Schöniger:

Técnica: Tome para ensaio ca. 15 mg de dicloridrato de piritioxina, pesados com precisão. Como líquido absorvente use 4 ml de hidróxido de sódio N/10, 6 ml de água e VI gotas de água oxigenada.

Depois de queimar a amostra consoante a técnica geral de Schöniger, agite o matrás por 10 m e deixe em repouso por 30 m. Lave a rolha e as paredes do matrás com 2 ml de água. Ferva 1 m. Arrefeça e leve o soluto a pH = 3,5 usando hidróxido de sódio 0,02 N ou ácido azótico 0,02 N usando S.R. de azul de bromofenol como indicador.

Junte 1 ml de ácido acético a 20 %, 15 ml de acetona, 0,8 ml de S.R. de ditizona como indicador e titule com soluto de nitrato de chumbo 0,02 N até viragem para vermelho.

Execute um ensaio a branco e desconte o seu valor do valor acima obtido.

Cada ml de nitrato de chumbo 0,02 N corresponde a 0,3207 mg de enxôfre. O cloridrato de piritioxina contém 13,93 % de S, tolerando-se um afastamento de 2 % deste valor.

b) Doseamento bromométrico da piritioxina

Os dissulfuretos são oxidáveis pelo bromo dando derivados sulfónicos. Neste caso uma molécula adicional de bromo fixa-se igualmente sobre o núcleo.

Técnica: Tome para ensaio ca. 0,1 g rigorosamente pesados de dicloridrato de piritioxina seco no vácuo sulfúrico. Dissolva em 20 ml de água e junte 5 ml de ácido clorídrico conc. e 50 ml de soluto de bromo N/10. Agite mecânicamente por 15 m e deixe em repouso por mais 15 m.

Junte 20 ml de soluto a 10 % de iodeto de potássio e titule com soluto N/10 de hipossulfito de sódio.

Execute paralelamente um ensaio a branco e desconte o seu resultado. Cada ml de soluto N/10 de bromo corresponde a 3,28 mg de $C_{16} H_{20} O_4 N_2 S_2, 2ClH, OH_2$.

O dicloridrato de piritioxina deve corresponder no mínimo a 98 % de $C_{16} H_{20} O_4 N_2 S_2, 2ClH, OH_2$.

c) Doseamento colorimétrico da piritioxina

Uma reacção mais específica e sensível, particularmente aconselhável para o doseamento do princípio activo em formas galénicas, é a que se baseia na

reação da NN-dietil-p-fenilendiamina com o dicloridrato de piritioxina que em presença de um agente oxidante, como o ferricianeto de potássio, dá origem à formação de um corante indofenólico, de cor azul, extractável pelo benzeno.

Técnica: Prepare uma solução padrão de dicloridrato de piritioxina em água a 30 mg %. Use como solução de trabalho uma diluição a 2,5 % daquela solução.

Para ampolas de decantação, pipete sucessivamente: 10; 7,5; 5; 4; 3; 2 ml da solução de trabalho, completando 10 ml com água. Adicione em cada caso, 3 ml de tampão de fosfato de Sörensen, (pH = 7), 1 ml de S.R. de cloridrato de dietil-p-fenilendiamina e 10 ml de benzeno. Agite.

Junte, gota a gota, deixando escorrer pelas paredes da ampola, 1 ml de S.R. de ferricianeto de potássio a 1%. Agite durante 30 segundos. Separe a fase aquosa e filtre a camada benzênica através dum pequeno tampão de algodão coberto com sulfato de sódio anidro.

Execute um branco com os reagentes.

Leia no espectrofotómetro as densidades ópticas das diferentes soluções a 605 m μ , contra o branco, em tinas de vidro de 1 cm de espessura. Verifique a boa obediência à lei de Lambert-Beer, na zona de concentrações compreendida entre 15 e 150 γ /ml de dicloridrato de piritioxina.

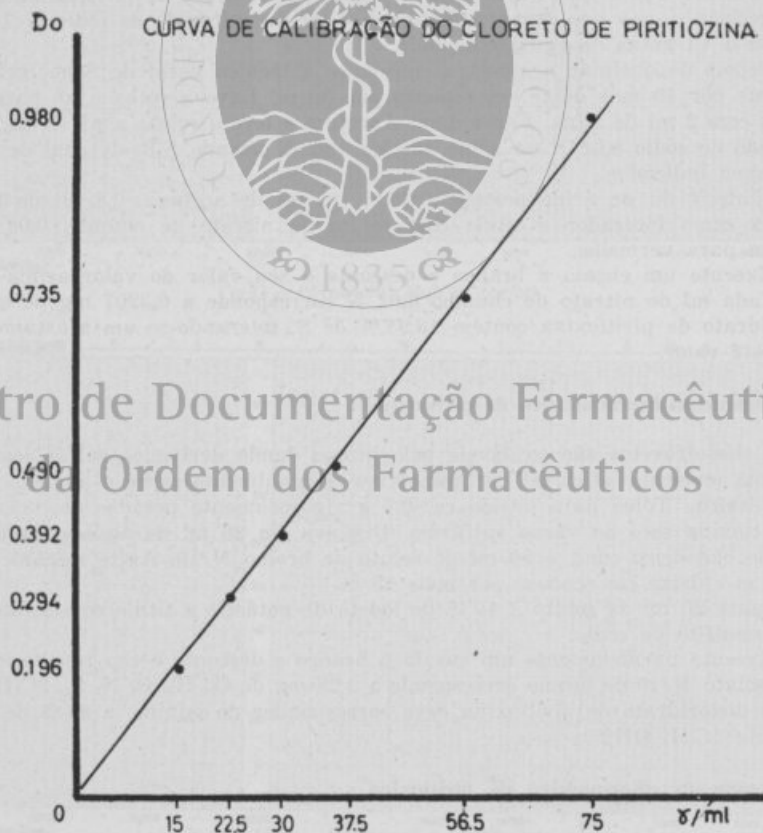


Fig. 3

CONCLUSÕES

Os métodos analíticos acima descritos permitem verificar rigorosamente a qualidade da matéria-prima e das respectivas formas galénicas, tanto durante o fabrico como no produto acabado, sob o duplo aspecto da identificação e doseamento do princípio activo. Fornecem igualmente uma base analítica para o estudo da estabilidade da piritioxina em preparações farmacêuticas.

SUMMARY

Qualitative and quantitative tests for pyriithoxine

Methods for qualitative and quantitative analysis of bis (3 hydroxymethyl-2 methylpyridol (5) methyl) disulfide, dihydrochloride, are described.

They include colorimetric and fluorometric reactions for identification of this compound, U.V. and I.R. spectra. Microanalytical, bromometric and colorimetric methods of assay are also described. Colorimetric assay is based on the reaction between this compound and diethyl-p-phenilenediamine.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ADAM, C. e HAMELMANN, H.: *Munch. Med. Woch.* **22**, 1045-1047 (1964).
 (²) CALDÉRON, J. M.: *Rev. Pract. Medico-Quirg. Intern.* — Set.º Out.º (1960).
 (³) Dados experimentais e Toxicológicos comunicados pelos LAB. E. MERCK (não publicados).
 (⁴) EICHHORN, D. e TATZEL, H.: *Arzliche Praxis* **15**, 1263-1264 (1963).
 (⁵) KOHLMANN, TR. e RETT., A.: *Die Mediz. Welt* N.º 43, (1963).
 (⁶) LUSTIG, GR.: *Arzliche Praxis* N.º 22, 1401-1402 (1963).
 (⁷) QUADBECK, VON G.; LANDMANN, H. R.; SACHSSE, W. e SCHMIDT, I.: *Med. Exp.* **7**, 144-154 (1962).
 (⁸) ROSENAU, VON H.: *Munch. Mediz. Woch.* **7**, 330-331 (1962).
 (⁹) SORIA, J. e TEJEIRA, J.: *Rev. de Med. da Est. Gen. de Navarra*, **4**, 91-108 (1960).
 (¹⁰) TEJEIRA, J. e MARTINEZ-LAGE, M.: *Rev. de Med. da Est. Gen. de Navarra* **4**, 332-333 (1960).
 (¹¹) VILA BADÓ, J. e SANSÓ DIES, J. M.: *Medicina Clínica* **36**, 95-104 (1961).
 (¹²) HKDY O. e URBANOVA L.: *Ceskoslov. Farmac.* **6**, 510 (1957).
 (¹³) SIGGIA, S. e EDSBERG, R. L.: *Analyt. Chem.* **20**, 938-939 (1948).

(Trabalho realizado no Serviço de Estudos e Ensaios dos Laboratórios Azevedos — Sociedade Industrial Farmacêutica).

Centro de Documentação Farmacêutica
 da Ordem dos Farmacêuticos

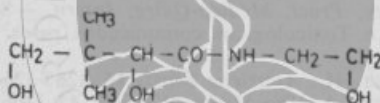
OS MÉTODOS INSTRUMENTAIS EM ANÁLISE FARMACÊUTICA — III — a) ANÁLISE POLAROGRÁFICA DO PANTENOL EM PREPARADOS MULTIVITAMÍNICOS

GERARDO MATTA

E. SIMÕES LOPES

Químico-Farmacêuticos

O D-pantenol tem a seguinte fórmula de estrutura:



Do ponto de vista analítico, não apresenta espectro utilizável no U.V. nem está descrito o seu doseamento polarográfico. De todos os métodos instrumentais só lhe pode ser directamente aplicada a polarimetria, com os seus conhecidos inconvenientes de fraca especificidade e de baixa sensibilidade. Com efeito, esta técnica só convirá para soluções injectáveis muito simples ou no controle durante o fabrico.

A D.A.B. 7 doseia o pantenol por um método volumétrico que inclui uma hidrólise alcalina da função amida, seguida de titulação do ácido pantóico resultante, em presença do 3-amino-1-propanol, previamente bloqueado com formol.

Todos os métodos colorimétricos descritos na literatura para doseamento do pantenol em produtos multivitamínicos, envolvem também uma hidrólise e, as reacções coradas recomendadas, são executadas sobre os produtos dessa hidrólise, o que lhes diminui bastante a especificidade.

WOLLISH e SCHMALL (1) convertem o pantoil-lactona, proveniente da hidrólise ácida no correspondente ácido hidroxâmico, tratando com hidroxilamina em meio alcalino e medindo a cor característica do hidroxamato de ferro formado por adição de cloreto férrico. É sabido que a maioria dos ácidos carboxílicos dão, igualmente, esta cor. Os mesmos autores (2), doseiam também o outro produto da hidrólise, o 3-amino-1-propanol, com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio. Este processo oferece melhor reprodutibilidade. A mesma substância pode dosear-se colorimetricamente com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (3).

SZALKOWSKY e DAVIDSON (4) doseiam o ácido pantóico ou a sua lactona com 2,7-naftalenodiol, em ácido sulfúrico concentrado, obtendo um complexo verde amarelado. SCHMALL e WOLLISH adaptaram ao doseamento do pantenol em preparados multivitaminados um método baseado na reacção do β alanol com a 1,2-naftoqui-

nona-4-sulfonato de sódio, assim como um outro método com ninidrina, descoberto originalmente por MOOR e STEIN⁽⁵⁾.

O estudo crítico de todos estes métodos revela antes de mais nada o inconveniente da hidrólise inicial que alonga extremamente o tempo de análise, o qual chega a atingir na hidrólise ácida 3 horas. Depois, a falta de especificidade, obriga sempre à inclusão de um ou mais passos de cromatografia em coluna. Por fim, as reacções coradas fornecem em muitos casos produtos instáveis e a leitura espectrofotométrica tem de ser feita em períodos curtos: 60 segundos no processo do hidroxamato de ferro.

O método que propomos baseia-se na formação de um complexo estável entre o pantenol e o ião cúprico seguido do seu doseamento polarográfico. Foi-nos sugerido pela reacção de identificação da D. A. B. 7 para o pantenol, com sulfato de cobre e hidróxido de potássio 3N. Aumentámos-lhe a sensibilidade usando hidróxido de sódio a 30 %, o que contribui de resto para formar uma boa solução de base. Os produtos corados presentes não interferem a não ser que sejam polarografáveis a potenciais de baixo valor absoluto.

A grande vantagem do método proposto reside sobretudo na eliminação da hidrólise e das evaporações ou concentrações indispensáveis nos métodos anteriormente apresentados.

Em produtos multivitamínicos é aconselhável separar o pantenol da vitamina B₂ e de produtos que possam igualmente formar complexos com o cobre, como por exemplo, a vitamina B₆. Esta separação consegue-se eficazmente por dois processos: cromatografia em resinas trocadoras de iões ou tratamento prévio com sulfato de cobre a pH mais baixo que o da reacção final.

PARTE EXPERIMENTAL

A partir de uma solução padrão de pantenol em água a 1 mg/ml preparam-se diluições a 0,5; 0,375; 0,25 e 0,125 mg/ml que serão usadas na determinação da curva de calibração. Tomam-se para ensaio, em tubos de centrífuga, 20 ml destas diluições e juntam-se sucessivamente: 0,5 ml de sulfato de cobre 2N, 1 ml de hidróxido de sódio a 30 % e duas gotas de soluto recente de gelatina em água a 1 %. Misturam-se as soluções e deixam-se 15 m em repouso. Centrifuga-se durante 5 minutos, verte-se o soluto límpido para a tina polarográfica, faz-se passar azoto 5 m e executa-se a polarografia nas seguintes condições:

Altura da coluna de mercúrio: 500 mm.

Polarografia normal entre 0 e -1 volte.

Sensibilidade: 4×10^{-7} A/mm.

Corrente do condensador: 1. Damping: 1.

Sentido directo. Velocidade de registo: 3.

Executa-se simultaneamente um ensaio a branco para determinação da corrente residual que se desconta dos valores obtidos.

O polarógrafo por nós empregado é da marca ORION. Os resultados estão expressos nas figuras 1 e 2.

1. APLICAÇÃO A MEDICAMENTOS MULTIVITAMÍNICOS

O método descrito foi aplicado na determinação do pantenol num soluto injectável de BÉCOMVITE, contendo vitaminas B₁, B₂, B₆, PP e B₁₂. O método funciona eficazmente desde que se eliminem previamente as vitaminas B₂ e B₆ o que se consegue por qualquer dos processos seguintes:

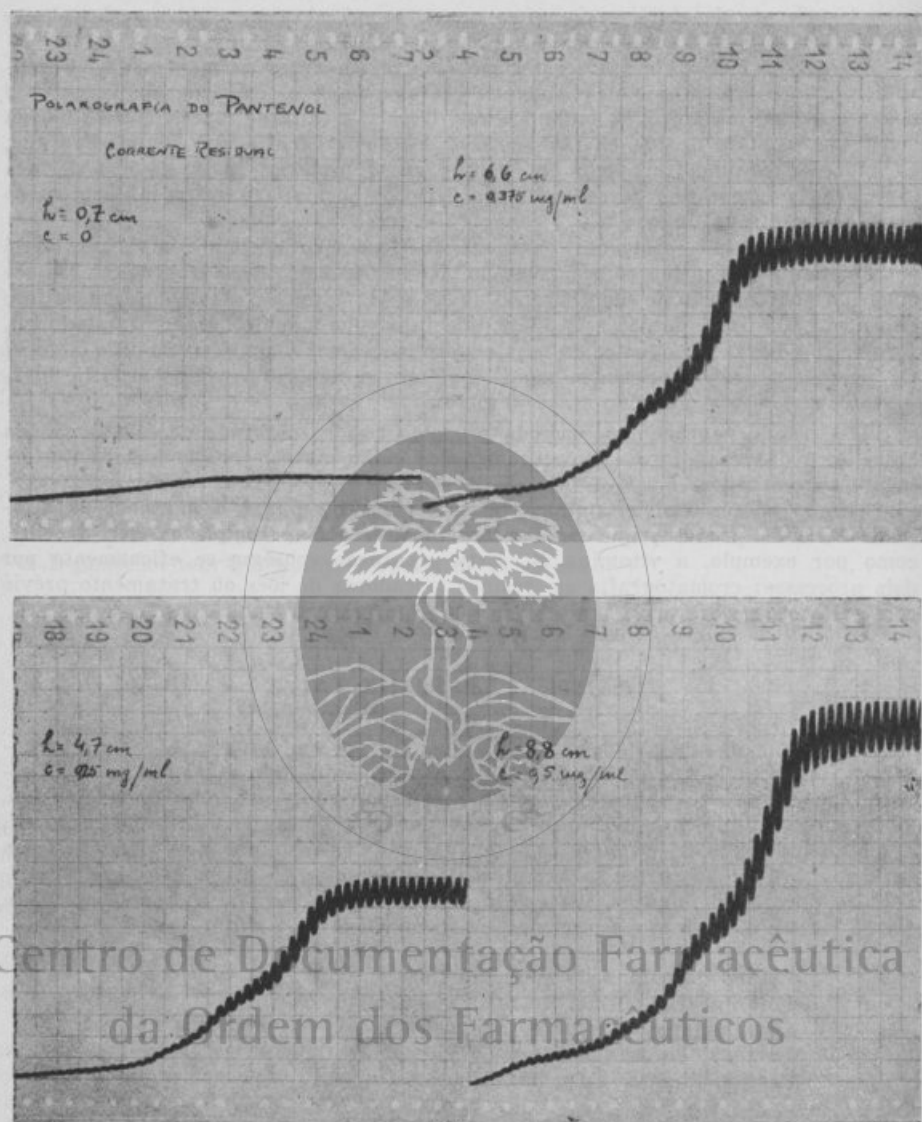


Fig. 1

) Cromatografia em resina de Amberlite IRA 400-OH.

Toma-se para ensaio um volume correspondente a 12,5 mg de pantenol e deposita-se sobre uma coluna de Amberlite IRA 400—OH com 5 cm de altura e 1,4 cm de diâmetro.

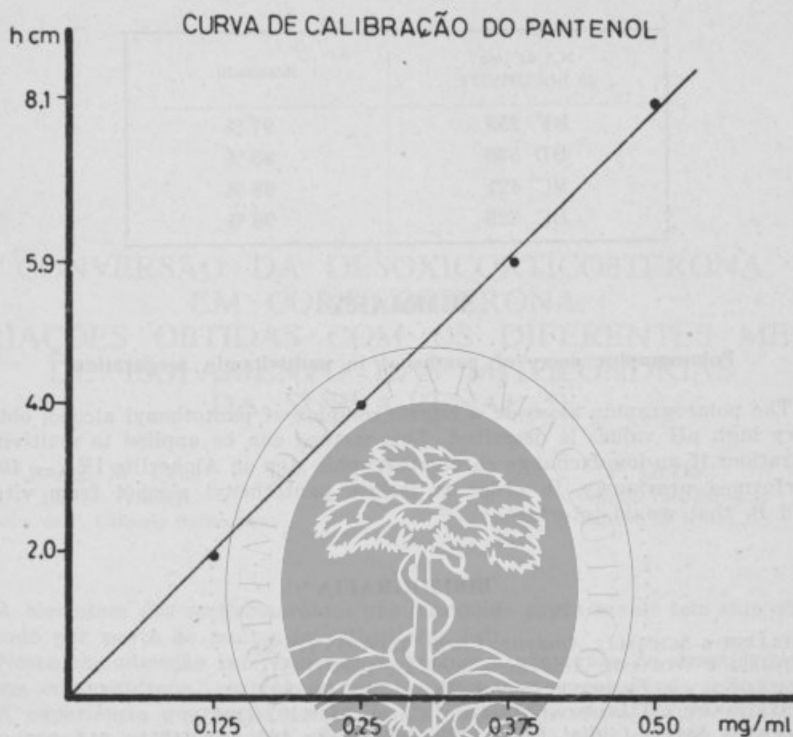


Fig. 2

Regenera-se a coluna fazendo passar 50 ml de hidróxido de sódio a 10 %, lavando com 25 ml de água seguidos de 50 ml de ácido clorídrico a 10 %; novamente 25 ml de água e, por fim, 50 ml de hidróxido de sódio a 10 %, lavando até que as águas de lavagem venham neutras.

Após a absorção do soluto injectável na coluna, elui-se com água até completar 50 ml. A velocidade de queda das gotas deve ser de 10 gotas por minuto. Tomam-se 20 ml deste soluto e executa-se a técnica já descrita.

b) Tratamento prévio com sulfato de cobre.

Alternativamente pode obter-se o mesmo resultado usando o seguinte método: toma-se para ensaio o volume do medicamento correspondente a 12,5 mg de pantenol, dilui-se com água até 15 ml e junta-se 1,5 g de sulfato de cobre. Agita-se até dissolver, juntam-se 3 g de hidróxido de cálcio e deixa-se em repouso, agitando ocasionalmente, durante 30 minutos. Filtra-se por placa G4 e completam-se 50 ml, lavando de cada vez o copo e o residuo sólido, no filtro.

A este pH, o pantenol não complexa o cobre. Retiram-se 20 ml do soluto e executa-se o ensaio polarográfico da forma já descrita.

Em qualquer hipótese, é conveniente acompanhar a dosagem com um ensaio padrão, executado sobre um soluto contendo pantenol na concentração adequada.

O quadro I resume alguns dos resultados obtidos:

QUADRO I

N.º de lote do BECOMVITE	Resultado
BF 258	97 %
BD 530	95 %
BC 421	98 %
BC 325	96 %

SUMMARY

Polarographic assay of panthenol in multivitamin preparations

The polarographic assay of a cupric complex of pantothenyl alcohol obtained at very high pH values is described. This method can be applied to multivitamin preparations if an ion exchange chromatographic step on Amberlite IRA — 400 OH is performed previously, in order to isolate pantothenyl alcohol from vitamins B₂ and B₆ that would interfere.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WOLLISH e SCHMALL: *Analytic. Chem.* **22**, 1033 (1950).
 (²) SCHMALL e WOLLISH: *Analytic. Chem.* **29**, 1509 (1957).
 (³) SZALKOWSKY e FREDIANI: *Cereal Chem.* **28**, 218 (1951).
 (⁴) SZALKOWSKY e DAVIDSON: *Analytic. Chem.* **25**, 1192 (1953).
 (⁵) MOORE e STEIN: *J. Biol. Chem.* **176**, 367 (1948); **192**, 663 (1951); **211**, 907 (1954).

(Trabalho realizado no Serviço de Estudos e Ensaio dos Laboratórios Azevedos — Sociedade Industrial Farmacêutica).

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

CONVERSÃO DA DESOXYCORTICOSTERONA
EM CORTICOSTERONA.
VARIAÇÕES OBTIDAS COM OS DIFERENTES MEIOS
DE ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS
DA SUPRA-RENAL (*)

ISABEL M. CRUZ

Lic. em Farmácia
Bolsista da F. Calouste Gulbenkian

F. GUERRA

1.º Assíst. Fac. Farmácia
Bolsista do I. A. C.

A biosíntese dos corticosteróides nas glândulas supra-renais tem sido objecto de estudo por parte de muitos investigadores (1,2).

Nesta comunicação referir-nos-emos apenas à conversão da desoxicorticosterona em corticosterona, reacção enzimática essa que se passa nas mitocôndrias.

A experiência que temos acerca da influência dos meios de isolamento e de incubação sobre as funções das mitocôndrias de fígado e de cérebro levou-nos a estudar comparativamente a acção de alguns meios de isolamento das mitocôndrias da supra-renal e verificar as possíveis alterações em relação à sua capacidade biosintética dos corticosteróides.

Ensaíamos assim meios de isolamento contendo:

1 — Sacarose 0,25 M + TRIS 20 mM + Nicotinamida 20 mM + EDTA 1 mM

2 — Sacarose 0,25 M + TRIS 20 mM + Nicotinamida 20 mM

3 — Apenas Sacarose 0,25 M

Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de GUERRA, PÉRON e MCCARTHY (3), quando utilizaram como meio isolante sacarose 0,25 M + TRIS 20 mM + Nicotinamida 20 mM + EDTA 1 mM.

Após o isolamento das mitocôndrias nos referidos meios: DE PÉRON e colaboradores (4) (designado por mistura A, contendo sacarose, TRIS, nicotinamida e EDTA e mistura B com sacarose, TRIS e nicotinamida) ou em qualquer outro meio dos já citados, as mitocôndrias foram incubadas em tubos rolhados, para onde previamente se haviam medido os componentes do meio de incubação, convenientemente borbulhados com uma mistura de 95 % de oxigénio e 5 % de anidrido carbónico.

Os componentes do meio de incubação no tubo controle (tubo 1) são: TRIS 0,15 M (132 µl), NaCl 0,154 M (105 µl), Nicotinamida 0,5 M (104 µl), KC1 0,154 M (560 µl) e DOC 607/0,01 ml (10 µl). Para os outros tubos, além do que

(*) Agradecemos à Dr.ª D. Maria Tereza Vasconcelos a colaboração prestada na determinação das proteínas.

se mediu para o tubo controle, juntaram-se os substratos a ensaiar. Assim, para o tubo 2 mediram-se 20 μ l de TPNH (600 γ /0,02 ml) e fez-se a correcção do volume usando apenas 540 μ l de KCl 0,154 M; para o tubo 3 mediram-se 101 μ l de ácido isocítrico 0,1 M e apenas 460 μ l de KCl 0,154 M. Esta quantidade de KCl foi igual para o tubo 4 com 103 μ l de ácido cítrico 0,1 M e para o tubo 5 com 104 μ l de ácido succínico 0,1 M.

Após a adição de 100 μ l da suspensão das mitocôndrias a todos os tubos, estes são postos a incubar durante 30 minutos num banho de água a 37° C, com agitação em cada 5 minutos. Após este tempo, os tubos são, pronta e rapidamente, arrefecidos numa mistura de neve carbónica e acetona, que paralizará todas as reacções incluindo a hidroxilação em 11 β .

Retiram-se partes alíquotas destes tubos para se proceder à determinação fluorométrica da corticosterona por uma técnica que é uma modificação do método de Silber e colaboradores (11).

Esta técnica consiste em medir essas partes alíquotas para tubos especiais rolhados que contêm 260 μ l de álcool absoluto p.a. e 1,6 ml de água bidestilada. Extrai-se a corticosterona com éter de petróleo (de p.e. de 40 a 60° C) e depois com diclorometano que, por sua vez, extrai o corticosteróide. Adiciona-se soda 0,1 N para eliminar os estrogénios. Seguidamente adiciona-se SO₂H₂ a 80 % que produz com a corticosterona um composto altamente fluorescente. Para as leituras utilizámos o fluorómetro Farrand.

Foram também determinadas as proteínas totais pelo método de LOWRY (12).

Podemos observar no Quadro I os resultados expressos em μ g de corticosterona por tubo e μ g de corticosterona por mg de proteína. Os valores estão indicados por média dos valores obtidos com tubos controle, por média dos valores obtidos com os tubos contendo TPNH, e por média dos valores obtidos com os tubos contendo vários substratos, a saber, ácidos isocítrico e α -cetoglutárico, Ca ++, Ca ++ + TPNH e ácido cítrico.

QUADRO I

	Controle	TPNH	Isocítrico	Succínico	Ca ++	Ca ++ + TPNH	Cítrico
Meio isolante: SACAROSE 0,25M TRIS 20 mM NICOTINAMIDA 20 mM EDTA 1 mM	(a) 0,41	2,37	7,65	8,16	0,48	13,03	6,12
	(b) 0,90	5,09	15,91	16,85	0,94	30,87	14,19
Meio isolante: SACAROSE 0,25 mM	(a) 0,39	3,12	27,92	15,19	—	23,20	15,66
	(b) 0,73	5,88	48,62	34,58	—	53,20	36,05

(a) μ g/tubo.

(b) μ g/mg de proteína.

Nesse mesmo quadro apresentamos os valores comparativos entre os resultados obtidos com mitocôndrias preparadas com o meio de PÉRON e colaboradores e com as mitocôndrias preparadas apenas com sacarose.

Pode-se verificar a acção estimuladora do TPNH sobre os iões Cálcio, já anteriormente descrita (⁹, ¹¹, ¹⁴).

Paradoxalmente, quando as mitocôndrias isoladas da supra-renal são incubadas na presença de substratos, estes parecem provocar uma estimulação quando o meio de preparação das mesmas foi apenas sacarose.

Segundo o mesmo trabalho de GUERRA, PÉRON e MCCARTHY, a adição de Tris não teria outra função senão a de tamponar o meio, bem como a presença de EDTA 1 mM e nicotinamida 20 mM teriam a finalidade de se obterem preparações mais puras e fisiologicamente mais activas, evitando a possível contaminação por metais. Segundo KAUFMAN e KAPLAN (¹²), a perda de piridinonucleótidos pelas mitocôndrias ocorre nas formas oxidadas sobre as quais actua a DPNase. A presença de EDTA permite a oxidação destes compostos, mas previne a sua libertação das mitocôndrias.

Repetimos, portanto, que paradoxalmente os melhores resultados foram obtidos quando o meio de isolamento e de preparação das mitocôndrias era apenas sacarose, que tanto quanto sabemos não é protectora dos piridinonucleótidos.

Podemos apresentar várias hipóteses tendentes a justificar essa diferença nos resultados.

1.º — Os animais presentemente utilizados são de outra origem (provenientes da Alemanha) e observa-se que as supra-renais são de tamanho mais reduzido que a dos animais americanos, impondo-se portanto a realização de experiências relativas aos trabalhos já publicados, utilizando animais desta origem.

2.º — O método de preparação tem vindo a ser aperfeiçoado tanto no que respeita à técnica como ao tempo de preparação, o que pode permitir a obtenção de mitocôndrias apresentando elevado grau dos poderes oxidante e fosforilante.

3.º — A ausência de iões metálicos contaminantes, já que utilizámos em todas as preparações água bidestilada em aparelho de vidro.

No sentido de esclarecer qual a fonte de energia que permite a transformação de desoxicorticosterona em corticosterona, e com o intuito de esclarecer a possível interferência das diferentes zonas da cadeia de transporte de electrões, realizámos várias experiências com inibidores das quais apresentamos apenas um exemplo no Quadro II.

Enquanto o cianeto inibe o aceitador terminal da cadeia clássica de transporte de electrões, ou seja a citocromo-oxidase, a presença de ferricianeto como

QUADRO II

	$\mu\text{g}/\text{tubo}$	$\mu\text{g}/\text{mg de } ^*\text{proteína}$
ISOCÍTRICO	39,70	62,14
ISOCÍTRICO + CN ⁻ 1 mM	12,50	19,25
ISOCÍTRICO + CN ⁻ 3 mM	11,36	17,50
ISOC. + FERRICIANETO 1 mM	35,20	54,21
ISOC. + FERRICIANETO 3 mM	26,10	40,20
ISOC. + CN ⁻ 1 mM + FERRIC. 1 mM	7,95	12,24
ISOC. + CN ⁻ 1 mM + FERRIC. 3 mM	6,81	10,50
ISOC. + CN ⁻ 3 mM + FERRIC. 1 mM	4,83	7,44
ISOC. + CN ⁻ 3 mM + FERRIC. 3 mM	5,39	8,30

aceitador de electrões ao nível do citocromo c, no caso de se processar normalmente a corticosteroidogénese, eliminar-nos-ia a parte da cadeia citocrómica clássica compreendida entre o citocromo c e o citocromo a, como necessária a esta conversão.

Temos portanto os valores obtidos numa experiência em que utilizámos cianeto e ferricianeto e a sua combinação com o fim de estudarmos a sua acção.

Todas as experiências com inibidores foram realizadas com mitocôndrias preparadas apenas com sacarose.

Como conclusão destes ensaios, apenas podemos afirmar que a cadeia clássica de transporte de electrões está, pelo menos parcialmente, implicada na hidroxilação da desoxicorticosterona, já que mesmo na presença de cianeto 3 mM e de ferricianeto 3 mM a inibição não foi completa.

SUMMARY

Conversion of DOC in corticosterone. Variability of results induced by the different methods of adrenal mitochondria isolation

Several methods of adrenal mitochondria isolation from the rat were tested. Paradoxically the method of choice was sucrose as the only isolating medium.

The given results are referred only to the stimulating action of isocitrate, previously pointed as one of the best stimulators of 11 β -hydroxylation. It was also studied the action of some inhibitors of the electron transport chain upon this enzymatic hydroxylation.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WILSON, L.; NELSON, D. e HARDING, B.: *Federation Proc.*, Abstract **24**, 449, 1776 (1965).
- (²) WILSON, L. D.; NELSON, D. H. e HARDING, B. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 39 (1965).
- (³) HARDING, B. W.; WONG, S. H. e NELSON, D. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 415 (1964).
- (⁴) HARDING, B. e NELSON, D.: Endocrine Society Meeting, New York, Abstract 41 (1965).
- (⁵) HARDING, B. W.; WILSON, L. D. e WONG, S. H. e NELSON, D. H.: in R. I. DORFMAN, Steroids, Suppl. II, Holden Day, San Francisco, 51 (1965).
- (⁶) ESTABROOK, R. W.; COOPER, D. Y. e ROSENTHAL, O.: *Biochem. Z.*, **338**, 741 (1963).
- (⁷) OMURA, T.; SATO, R.; COOPER, D.; ROSENTHAL, O. e ESTABROOK, R. W.: Symp. on Electron Transport Systems in Microsomes, *Federation Proc.*, **24**, 1181 (1965).
- (⁸) KORITZ, S. B. e PÉRON, F. G.: *J. Biol. Chem.* **230**, 343 (1958).
- (⁹) PÉRON, F. G.; GUERRA, F. e MCCARTHY, J. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 277 (1965).
- (¹⁰) GUERRA, F.; PÉRON, F. G. e MCCARTHY, J. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 433 (1966).
- (¹¹) SILBER, R. H.; BUSCH, R. D. e OSLAPAS, R.: *Clin. Chem.* **4**, 278 (1958).
- (¹²) LOWRY, O. H. e LOPEZ, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **162**, 241 (1946).
- (¹³) PÉRON, F. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 62 (1964).
- (¹⁴) PÉRON, F. G.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1764 (1961).
- (¹⁵) KAUFMAN, B. T. e KAPLAN, N. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 332 (1960).

DETERMINAÇÃO DE RAZÕES ADP/O PELO ELÉCTRODO DE OXIGÉNIO

DULCE CAPELO P. VELOSO
Lic. em Farmácia
Bolseira da F. Calouste Gulbenkian

F. CARVALHO GUERRA
1.º Assist. Fac. Farmácia
Bolseiro do I. A. C.

Estudo comparativo das razões ADP/O nas mitocôndrias de fígado de rato determinadas pelo macro eléctrodo de oxigénio de CLARK, usando como aceitador o difosfato de adenosina, com as razões P/O obtidas pelo método clássico de WARBURG para a determinação do oxigénio e de FISKE e SUBBAROW para a determinação do fósforo.

Apesar de muito estudada, ainda pairam muitas dúvidas sobre a fosforilação oxidativa e o próprio RACKER, no início dum trabalho recente, apresentado num simpósio, sobre este assunto, dizia: «Tendo sido posto como um orador entre a brilhante exposição da simplicidade dos oradores precedentes e a análise lúcida dum fenómeno complexo que se seguirá, acho embaraçoso confessar que ainda não compreendo a fosforilação oxidativa» (1).

É muito grande, no entanto, o interesse da fosforilação oxidativa, pois é à custa da energia proveniente das oxidações biológicas, mantida sob a forma de ATP (trifosfato de adenosina) que são viáveis muitas das reacções no nosso organismo. Estas oxidações não se processam numa forma brusca, mas sim por etapas, o que permite o maior aproveitamento da energia produzida. Os substratos oxidados cedem os seus electrões à cadeia de transporte, e por cada molécula de DPNH oxidada formam-se três moléculas de ATP. Já vários autores como GREEN, FLEISCHER e LEHNINGER (2, 3) falaram no interesse da acumulação de energia sob a forma de ATP, permitindo a sua utilização nos trabalhos de transporte de solutos do exterior para o interior da mitocôndria. Também HUNTER e colaboradores (4) sugeriram que uma transferência activa de electrões dos substratos para o oxigénio seria um pré-requisito na obtenção da tumefacção, com as mitocôndrias isoladas de fígado; tal tumefacção dependeria de compostos energeticamente ricos obtidos durante o processo da fosforilação oxidativa.

O presente trabalho foi realizado com mitocôndrias isoladas de ratos albinos machos, pelo método de SCHNEIDER modificado (5), utilizando solução 0,33 M de sacarose, tendo-se feito outra série de ensaios em que na solução de sacarose adicionámos solução de EDTA (tetracetato de etilenodiamina) 0,1 mM e albumina bovina 1 mg/litro, concentrações finais.

Presentemente temos trabalhado com o macro eléctrodo de oxigénio de CLARK, usando como aceitador o ADP (difosfato de adenosina). Propusemo-nos comparar os resultados com os obtidos com os mesmos substratos mas em que as razões P/O foram calculadas determinando o oxigénio pelo método de WARBURG e o fósforo

pelo método de FISKE e SUBBAROW (⁶, ⁷) visto que, segundo LEHNINGER (⁸) a razão ADP/O nas mitocôndrias em que a fosforilação está fortemente ligada à oxidação é numericamente equivalente à razão P/O. Os resultados da razão P/O obtidos pelo método manométrico são apresentados no quadro I. Como podemos ver por

QUADRO I
FÍGADO — RAZÕES P/O
Método manométrico de Warburg

Substratos	ΔP	ΔO	P/O
Glutamato 12 mM	1,23	0,45	2,74
	1,32	0,50	2,64
	1,00	0,38	2,63
	1,03	0,41	2,51
β -Hidroxibutirato 15 mM	0,86	0,41	2,10
	0,83	0,39	2,13
	0,90	0,35	2,57
Succinato 12 mM	1,33	0,78	1,71
	1,38	0,84	1,64
	0,83	0,62	1,34
	1,72	0,98	1,76
α -Cetoglutarato 12 mM	1,36	0,41	3,32
	1,89	0,57	3,32
	1,86	0,61	3,05
	1,48	0,50	2,96
	1,43	0,40	3,58
	1,55	0,45	3,45

Os valores de ΔP e ΔO são referidos a 1 mg de proteína

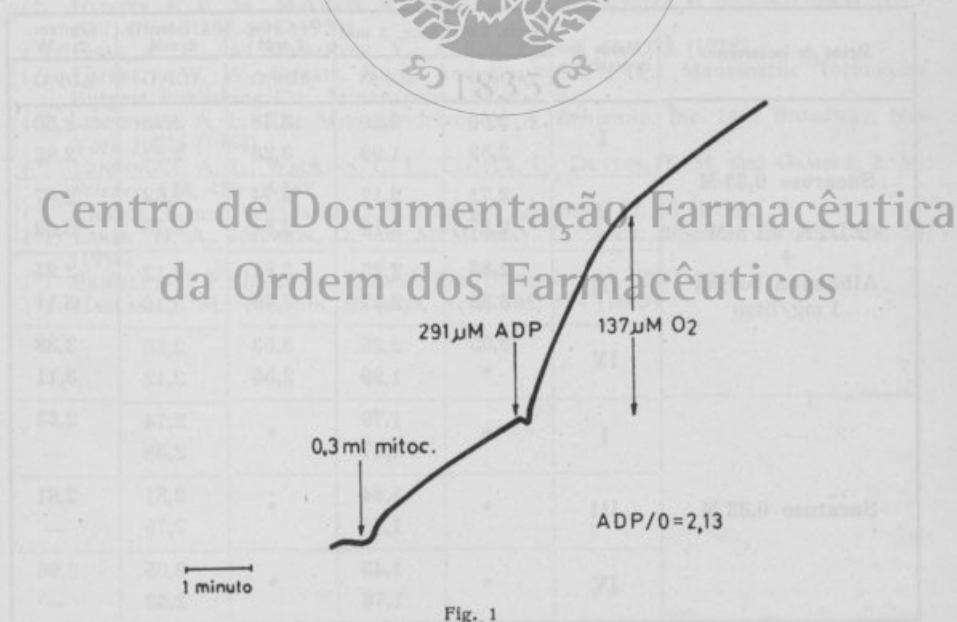
estes resultados, parece haver a formação das moléculas de ATP teoricamente previstas pela passagem dos electrões através da cadeia citocrômica geralmente aceite e estabelecida por vários autores, entre eles LEHNINGER, CHANCE e LARDY (⁹, ¹⁰, ¹¹). Assim, temos que o β -hidroxibutirato e o glutamato, cedendo os electrões ao nível dos piridinonucleotídeos, dariam três ATP, o succinato formaria 2, pois dá os seus electrões ao nível das flavinas e o α -cetoglutarato originaria 4, pois além das três moléculas de ATP formadas pela cedência dos electrões ao nível dos piridinonucleotídeos, ainda há a considerar um, proveniente da oxidação directa ao nível do substrato.

O facto de vários autores como BRIERLEY (¹²) da Universidade de Ohio e HASLAM (¹³) de Oxford terem apresentado causas de erros que podem advir da determinação do oxigénio pelo método manométrico, levou-nos a utilizar o macro eléctrodo de oxigénio. Fizemos duas séries de ensaios: uma, em que utilizámos

mitocôndrias de fígado de rato isoladas pelo método de SCHNEIDER modificado, empregando solução 0,33 M de sacarose, como tínhamos feito para o método manométrico; outra, em que o isolamento das mitocôndrias se fez utilizando o mesmo método mas em que a solução de sacarose foi adicionada de solução 0,1 mM de EDTA e albumina bovina 1 mg/litro, concentrações finais. Além dos substratos de que já falámos para o método manométrico, empregámos ainda o isocitrato que, como o β -hidroxibutirato e o glutamato, cede os electrões ao nível dos piridinonucleotídeos. A concentração dos substratos usados é 2 mM. Aqui, em vez da razão P/O, determina-se a razão ADP/O. A temperatura de experiência foi de 25° C. Usámos um aparelho BECKMAN com registador automático. Acertámos o zero com água azotada e o 100 com água bidestilada cuja concentração em oxigénio, a 25° C, é de 240 μ M. Os meios de experiência utilizados foram os seguintes:

- I — Sacarose 215 mM + tampão de Tris [tris (hidroximetil) aminometano] + fosfato 9 mM + $MgCl_2$ 7 mM.
 II — Sacarose 215 mM + EDTA 0,1 mM + albumina bovina 1 mg/litro + TRIS 22 mM + fosfato 9 mM + $MgCl_2$ 7 mM.
 III — KCl 113 mM + TRIS 22 mM + fosfato 9 mM + $MgCl_2$ 7 mM.
 IV — Sacarose 62 mM + KCl 19 mM + fosfato 5 mM + $MgCl_2$ 19 mM.

Colocámos o meio de experiência com o meio a estudar, no banho a 25° C e deixámos estabilizar. Adicionámos a suspensão de mitocôndrias (correspondente a cerca de 2,5 mg de proteína) e, após um leve consumo, adicionámos uma quantidade de ADP rigorosamente medida (0,8 μ moles em todas as experiências). Após cada adição, procedemos a uma agitação cuidadosa. Pelo gráfico pudemos determinar a quantidade de oxigénio consumida durante a transformação do ADP adicionado (¹⁶). Como exemplo, apresentamos alguns dos gráficos obtidos directamente com o registador automático (Figs. 1 e 2).



Mitochondrias isoladas com sacarose, EDTA e albumina bovina; substracto utilizado, succinato; meio de experiência, II

Verificámos que as mitocôndrias isoladas em sacarose, EDTA e albumina apresentam maior actividade que as isoladas somente em sacarose. Em experiências realizadas com estas últimas mitocôndrias e quando empregámos como substrato o isocitrato e o α -cetoglutarato, não conseguimos observar o fim da reacção; parecia haver adenosina trifosfátase a funcionar de maneira que o ATP, à medida que se formava, se ia dissociando (quadro 2).

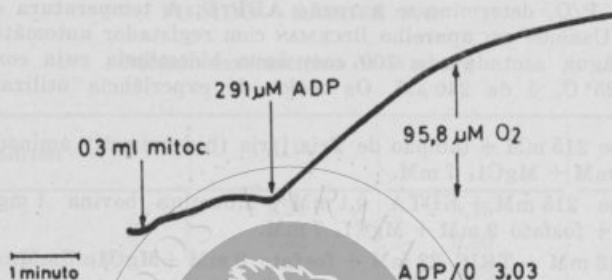


Fig. 2
Mitocôndrias isoladas com sacarose; substrato utilizado, β -hidroxibutirato;
meio de experiência, IV.

QUADRO II
FIGADO — RAZÕES ADP/O
Método do eléctrodo de oxigénio

Meios de isolamento	Meios de experiência	Isocit. 2 mM	Succ. 2 mM	α -Cetog. 2 mM	β -Hidroxib. 2 mM	Glutam. 2 mM
		ADP/O	ADP/O	ADP/O	ADP/O	ADP/O
Sacarose 0,33 M EDTA 0,1 mM + Albumina bovina 1 mg/litro	I	2,60	2,20	3,48	2,73	2,50
		2,52	1,99	3,28	2,82	2,82
	II	2,71	2,17	2,74	2,62	2,67
		2,87	2,13	2,84	2,78	3,08
	III	2,85	2,25	3,81	3,12	2,91
		3,33	2,47	3,56	3,16	3,11
	IV	3,05	2,25	3,53	2,86	3,38
		*	1,99	2,55	3,12	3,11
Sacarose 0,33 M	I	*	1,79	*	2,74	2,63
		*	1,67	*	2,38	—
	III	*	1,84	*	2,81	2,81
		*	1,73	*	2,75	—
	IV	*	1,45	*	3,05	2,90
		*	1,76	*	2,63	—

(*) Ensaio em que não foi possível calcular razões ADP/O.

Temperatura de incubação: 25° C.

Observámos ainda, que nas mitocôndrias, a capacidade de fosforilação oxidativa difere com os meios de experiência utilizados. Os valores de ADP/O mais altos são os obtidos com o meio de experiência III e os mais baixos com o meio II. Das mitocôndrias isoladas somente em sacarose, apenas com o succinato, β -hidroxibutirato e glutamato conseguimos obter valores de ADP/O. Os resultados obtidos com o meio IV não são uniformes. Com as mitocôndrias isoladas em sacarose, EDTA e albumina bovina e usando os meios I e III, como no método manométrico, obtivemos valores de ADP/O próximos dos teoricamente previstos.

SUMMARY

Determination of P/O rates trough O_2 electrode

This article deals with the comparison of the results obtained when determining P/O Ratios of liver mitochondria from the rat with CLARK'S O_2 Macro-electrode using ADP (adenosine's diphosphate) as acceptor with the results obtained determining O_2 consumption by the manometric method of WARBURG and phosphorus by FISKE and SUBBAROW'S method.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RACKER, E.: *Advan. Enzymol.*, **23**, 323 (1961).
- (²) GREEN, D. e FLEISCHER, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 554 (1963).
- (³) LEHNINGER, A. L.: Physical Organization of the Cell, in The Normal Cell and its Response to Allergic Stimuli, 38th Ross Conf. on Pediatric Research, Fomon, S. J., Ross Laboratories Columbus (1961).
- (⁴) HUNTER, F. E., JR., LEVY, J., FINK, J., SCHUTZ, B., GUERRA, F. and HURWITZ, A.: *J. Biol. Chem.* **234**, 2176 (1959).
- (⁵) HUNTER, F. E., JR., MALISON, R., BRIDGERS, W. F., SCHUTZ, B. and ATCHISON, A.: *J. Biol. Chem.* **234**, 693 (1959).
- (⁶) FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- (⁷) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. and STAUFFER, J. F.: *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis (1959).
- (⁸) LEHNINGER, A. L.: The Mitochondrion, W. A. Benjamin, Inc. 2465 Broadway, New York 10025 (1964).
- (⁹) LEHNINGER, A. L., WADKINS, C. L., COOPER, C., DEVLIN, T. M. and GAMBLE, J. M.: *Science*, **128**, 450 (1958).
- (¹⁰) CHANGE, B. and WILLIAMS, G. R.: *Advan. Enzymol.*, **17**, 65 (1956).
- (¹¹) LARDY, H. A., JOHNSON, D. and MCMURRAY, C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 587 (1958).
- (¹²) BRIERLEY, C. P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 500 (1965).
- (¹³) HASLAM, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 184 (1965).

ABSORÇÃO INTESTINAL DO FERRO

ERMELINDA VIEIRA GASPAR

Licenciada em Farmácia

Na sequência de alguns trabalhos que vinhamos fazendo sobre o metabolismo do ferro, tentámos ver o comportamento do homem normal e carenciado, sujeito a uma terapêutica marcial, no que respeita à absorção intestinal do metal.

Normalmente, a quantidade de ferro alimentar excede as necessidades biológicas. Então, em condições normais, só uma parte é absorvida através do duodeno e parte superior do jejuno. Este bloqueio, é uma forma de defesa do organismo contra o aumento prejudicial do Ferro, já que se trata dum elemento difícil de eliminar. Um excesso de Ferro, ou um mau aproveitamento metabólico, leva a depósitos anormais, criando situações patológicas difíceis de resolver.

A absorção parece estar relacionada com o grau de saturação do organismo, não sendo ainda bem conhecido o mecanismo de contróle. O ferro ingerido, geralmente sob a forma oxidada, é reduzido no estômago sob a acção de ClH ou de substâncias redutoras nomeadamente a vitamina C ou a própria pepsina. Entrando então na parede intestinal sob a forma reduzida, parece voltar à forma oxidada, formando um complexo proteico com a apoferritina. O composto resultante, ferritina, liberta-o no polo vascular da célula sob a forma reduzida, passando então à corrente circulatória. Aqui liga-se total ou quase totalmente à transferrina. Esta proteína específica de transporte do ferro encontra-se apenas saturada na sua terça parte. Os restantes dois terços, (capacidade latente de fixação) destina-se à captação do metal que vai sendo absorvido.

Segundo alguns autores, não sofre variações quantitativas. Segundo outros porém, encontra-se em parte sequestrada nalguns órgãos, estando portanto sujeita a variações na corrente circulatória, onde seria chamada por acção de qualquer estímulo, possivelmente de origem nervosa. É interessante notar que em alguns dos nossos doentes, verificámos elevação da siderofilinémia antes da subida da siderémia.

Como dissemos atrás, parece que a absorção do ferro está condicionada com o grau de saturação do organismo, em especial das células da parede intestinal, e da quantidade existente na corrente circulatória. Os indivíduos carenciados seriam mais ávidos e absorvê-lo-iam em quantidades apreciáveis. Nos não carenciados, em virtude do bloqueio intestinal seria diminuta a entrada do ferro.

Porém, não é com esta simplicidade que explicamos os resultados que obtivemos em dois grupos de indivíduos carenciados e não carenciados, que submetemos à administração oral de ferro reduzido pelo hidrogénio. O nosso estudo baseou-se na dosagem da siderémia e da siderofilinémia, antes e depois da administração do metal, e em tempos diferentes.

No primeiro grupo, indivíduos não carenciados, tudo se passou como era de esperar. Não houve variações apreciáveis da siderémia nem da siderofilinémia. (Fig. 1 e 2).

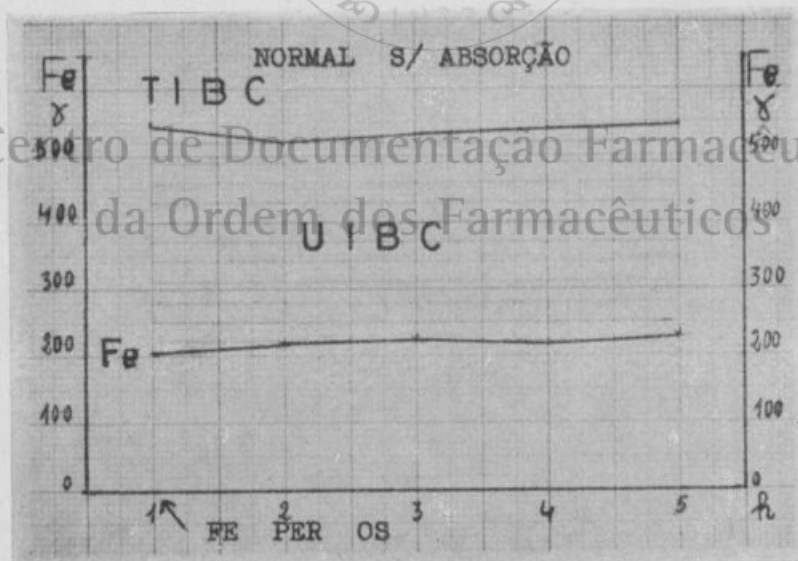
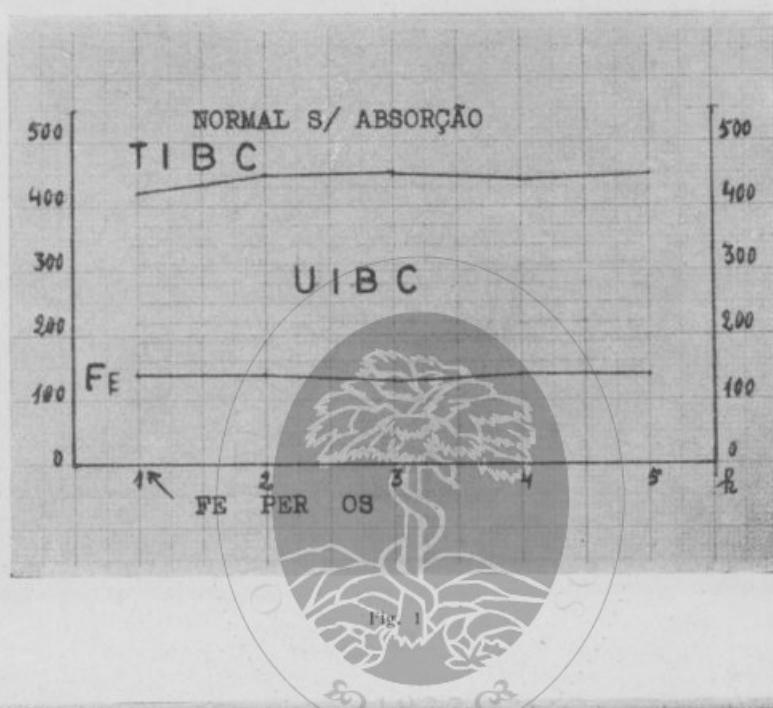


Fig. 2

Porém, no grupo de indivíduos carenciados, o comportamento foi diferente, podendo estabelecer-se 3 sub-grupos:

- 1 — Indivíduos onde não se verificou modificação das taxas sanguíneas da siderémia e da siderofilinémia. (Fig. 3 e 4).

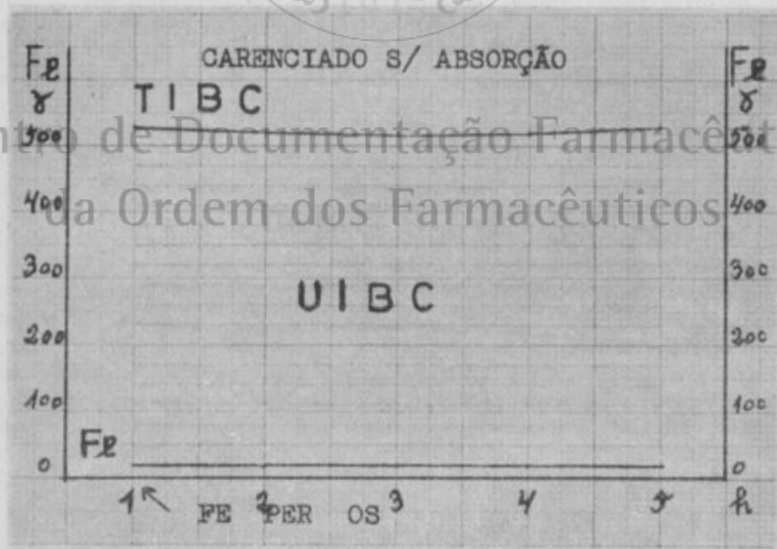
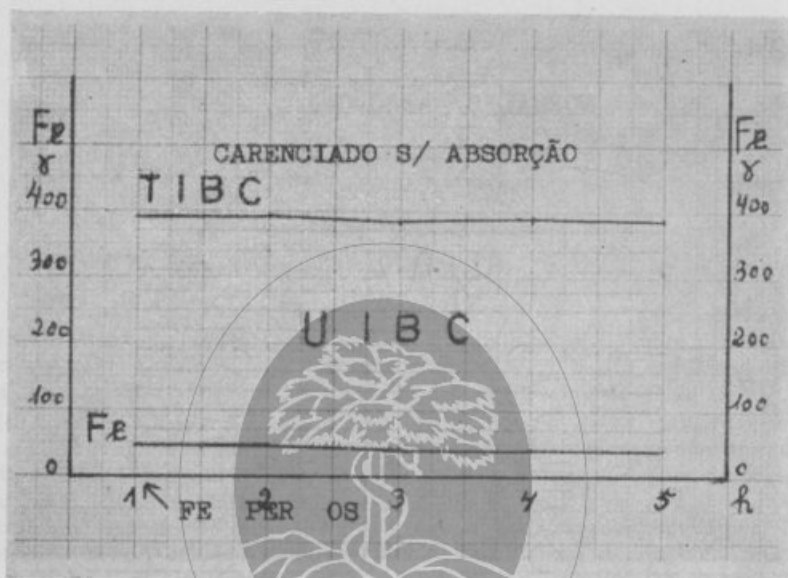


Fig. 4

2 — Doentes com elevação da siderémia acompanhada de subida, embora menor, da siderofilinémia. (Fig. 5 e 6).

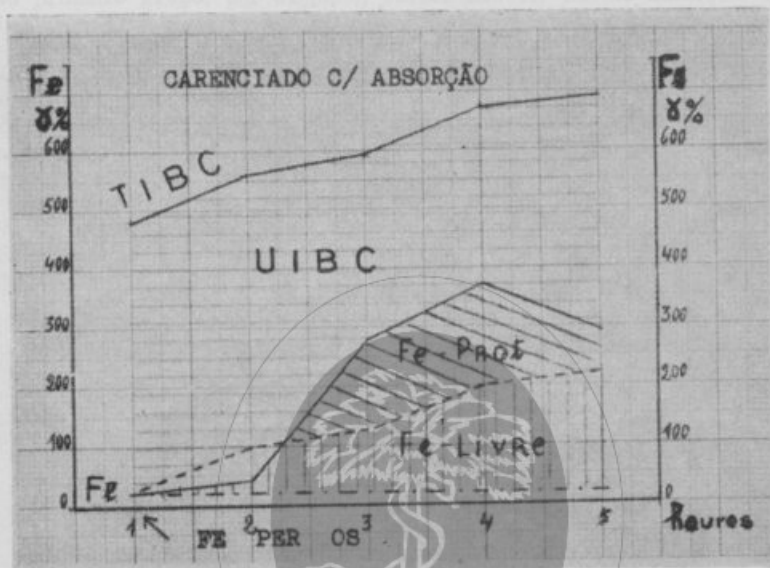


Fig. 5

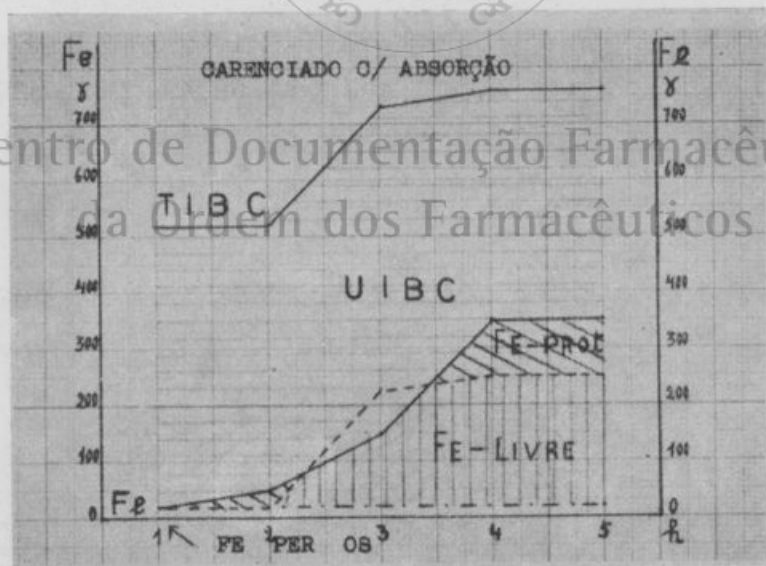


Fig. 6

3—No 3.º grupo de carenciados, verificou-se aumento da sideremia sem elevação da siderofilinemia. (Fig. 7 e 8).

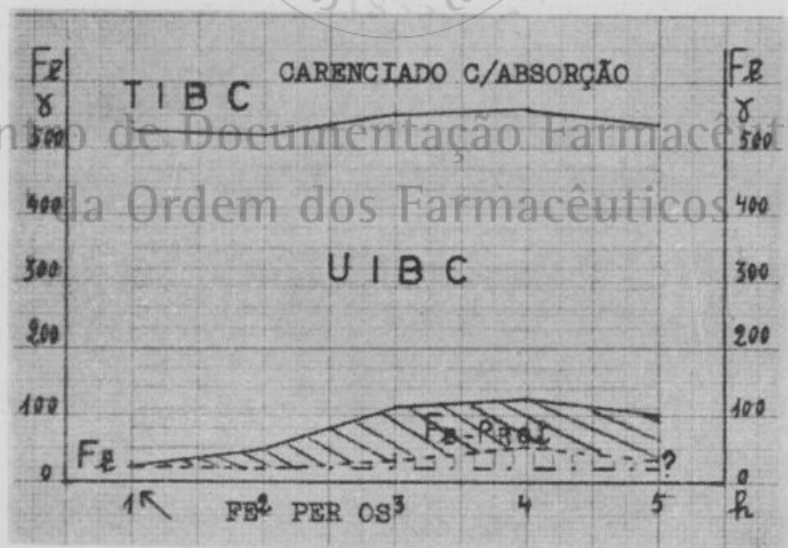
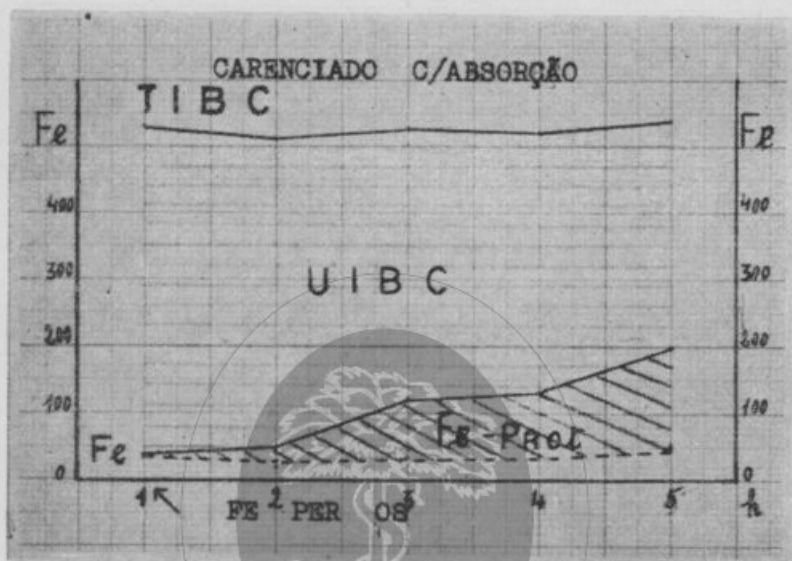


Fig. 8

O comportamento diferente deve estar relacionado com a causa próxima da carência do metal. Um doente pode apresentar siderémias baixas por deficiências localizadas em pontos diferentes da cadeia metabólica.

No primeiro grupo, por exemplo, parece não ter havido absorção. Opiniões autorizadas afirmam ser aquele resultado devido a uma passagem extremamente fugaz pela corrente circulatória, de modo a escapar à observação do bioquímico. De facto, a situação patológica de alguns doentes melhorou consideravelmente.

Mas é difícil de entender.

No 2.º grupo verificou-se haver um aumento da siderémia, acompanhado duma subida, embora menor, da siderofilinémia. Aparece-nos então uma parte do Ferro na forma livre, melhor dizendo não ligado à transferrina. E não dizemos na forma livre, porquanto os doentes não apresentaram sinais de intolerância ao ião-ferro.

No 3.º grupo, o aumento da siderémia não se fez acompanhar do aumento da siderofilinémia. Ausência de estímulo? (Fig. 9).

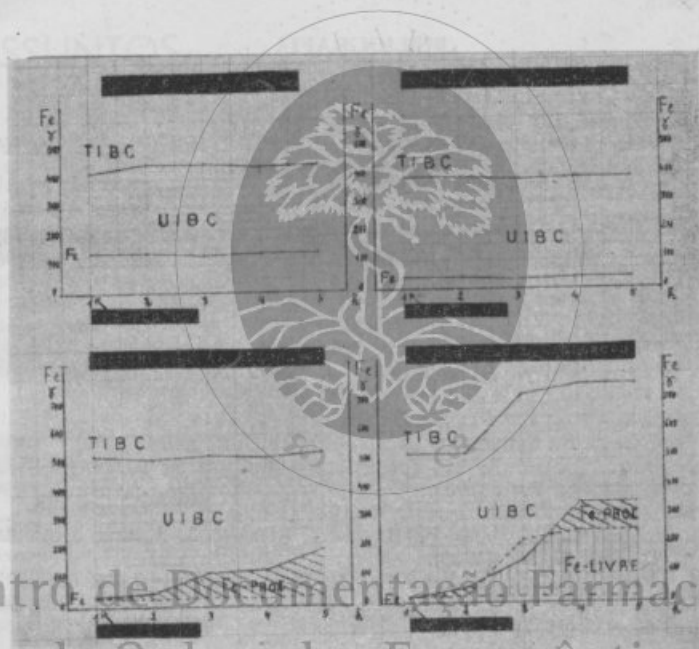


Fig. 9

Infelizmente as condições em que conseguimos estes dados, não nos possibilitaram um estudo pormenorizado de cada doente.

Permitimo-nos no entanto mostrar estes resultados a título de nota prévia.

SUMMARY

Intestinal absorption of iron

The intestinal absorption of iron was studied through per os administration of hydrogen reduced iron in normal and iron deficient individuals. Serum iron and serum iron binding capacity were determined before and after iron administration.

Between the iron deficient individuals three groups can be established:

1 — Patients whose serum iron and serum iron binding capacity remained without variation.

2 — Patients in which a raise of serum iron coexisted with a raise of serum iron binding capacity.

3 — Patients in which serum iron raised but serum iron binding capacity remained at control levels.

These observations lead to the conclusion that if iron is always absorbed by iron deficient patients its plasmatic transport should be very fast in some of these individuals, so it escapes from the biochemist observation other possibility we had to deal which is that iron shouldn't always need to be carried by the iron binding protein.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, J. C. DA CONCEIÇÃO. Tese — Coimbra, 1964.
- ASHTON, G. C.: *Nature*, **182**, 1102 (1958).
- BECKMAN, L.: *Nature*, **194**, 796 (1962).
- BOTHWEL, T. H. and MALLET, B.: *Biochim. J.* **59**, 599 (1955).
- BROWN, E. B., DUBACH R., SMITH D. E., REYNALFARGE C., MOORE C. V.: *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 862 (1957).
- BROWN, E. B., DUBACH R. and MOORE C. V.: *J. Lab. Clin. Med.*, **52**, 335 (1958).
- COSTA GOMES DA: XXVI Congress. Luso-Esp. Assoc. Progres. Cienc., **2**, 246 (1962).
- COSTA GOMES DA, SILVA J. A. F., MALDONADO F. E. S.: *Clin. Chem.*, **9**, 131 (1963).
- COSTA GOMES DA, SILVA J. A. F.: *J. Soc. Cienc. Méd. Lisboa*, **127**, 15 (1963).
- DAVIS A. E., BADENOCH J.: *Lancet*, **2**, 6 (1962).
- DREYFUS J. C., SCHAPIRA G.: *Sang.* **20**, 374 (1949).
- FEINSTEIN A. R., BETHARD W. F., MCCARTHY, J.: *J. Lab. Clin. Med.*, **42**, 907 (1953).
- GIBLETT E. R., HICKMAN C. G. and SMITHIES O.: *Nature*, **183**, 1589 (1959).
- GITLIN D., JANEWAY C. A., FARR L. E.: *J. Clin. Inv.*, **35**, 44 (1956).
- HARRIS H., ROBSON E. B., SINISCOLCO M.: *Nature*, **182**, 452 (1958).
- JUSTIN-BESANÇON L., LAMMOLTE M., LAMMOLTE-BARRILLON S., MARTIN E., Les hémochromatoses, Masson, Paris, 1963.
- MARTIN C. M., JANAÉ J.: *J. Clin. Invest.* **38**, 1024 (1959).
- MITCHELL J., HALDEN E. R., JOUER F., BRYAN S., STIRMAN J. A. and MUIRHEAD E. G.: *J. Lab. Clin. Med.* **56**, 555 (1960).
- MOORE C. V., DOAN C. A. and ARROWSMITH W. R.: *J. Clin. Invest.* **16**, 627 (1937).
- MUIRHEAD E. E., HALDEN E. R., MITCHELL J. H., STIRMAN J. A. and JONES F.: *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 935 (1957).
- PARKER W. C., BEARN A. G.: *Science*, **133**, 1014 (1961).
- PERKINS D. J.: *Biochim. J.* **89**, 93 P (1963).
- PETERS T.: *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 75 (1956).
- RIBEIRO V., MESSING; COSTA S. F., GOMES DA; SILVA J. A. F.; RELVAS M. G.: *J. Soc. Cienc. Med. Lisboa*, **125**, 571 (1961).
- ROBALO CORDEIRO, A. J. A.: Lição de Concurso para Prof. Ext., *J. do Médico* **58**, 813 (1965).
- ROBALO CORDEIRO, A. J. A.; TRINCÃO, R. C. A.; BREDÁ COIMBRA, H. L.; GASPÁR, E.; MESQUITA, A.; PROENÇA, M. F. B.: Em publicação.
- ROBALO CORDEIRO, A. J. A.; TRINCÃO, R. C. A.; MATOS BEJA, M. L.; GASPÁR E.; LIMA, M. A. M.; MESQUITA, A.: Em publicação.
- SCHADE and CAROLINE: *Science*, **104**, 340 (1946).
- TURNBULL, A. e GIBLETT, E. R.: *J. Lab. Clin. Med.* **57**, 450 (1961).
- WHEBY, M. S. and JONES, L. G.: *J. Clin. Invest.* **42**, 1007 (1963).

ÍNDICE

Volume XVI (1966)

1) ASSUNTOS:

<i>Absorção intestinal do Ferro</i>	466
<i>Aceto-hexamida (Características físico-químicas e métodos de doseamento da)</i>	169
<i>Adenda da Farmacopeia — Projectos de monografias</i> 64, 129 e	246
<i>Aerosóis (Os) em Farmácia</i>	363
<i>Amidofebrina com um novo anti-reumático de síntese (ICI-350) na forma de supositórios (Estabilidade da associação da)</i>	417
<i>Análise farmacêutica — III — a) Análise polarográfica do pantenol em preparados multivitamínicos (Os métodos instrumentais em)</i>	452
<i>Análise polarográfica do pantenol em preparados multivitamínicos (Os métodos instrumentais em análise farmacêutica — III — a)</i>	452
<i>Anidrovolumetria ácida e básica (O iodeto de ditiazanina como indicador de emprego simultâneo em)</i>	81
<i>Antifermentativas nos vinhos (Pesquisa por via biológica de substâncias)</i> ...	428
<i>Aspectos laboratoriais da pielonefrite crónica</i>	186
<i>Assembleia (II) da Amelpo</i>	254
<i>Assembleia (XXI) Geral da FIP — (XXVI Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas F. I. P.)</i>	69
<i>Assembleia geral do Sindicato Nacional dos Farmacêuticos</i>	140
<i>Associação Química Argentina</i>	71
<i>Bibliografia</i>	28, 102 e 199
<i>Características físico-químicas e métodos de doseamento da aceto-hexamida</i>	169
<i>Carbaril (Sevin) (Uma técnica cromatográfica expedita, de aplicação na extensão agrária para detecção do)</i>	175
<i>Cedência «in vivo» e «in vitro» (Comprimidos de acção prolongada de vit. B₁. Preparação e verificação da)</i>	420
<i>Cloridrato de pirritoxina (Estudo analítico do)</i>	444
<i>Comprimidos (Ensaio de friabilidade dos)</i>	374
<i>Comprimidos de acção prolongada de vit. B₁. Preparação e verificação da cedência «in vivo» e «in vitro»</i>	420
<i>Congresso (XXVI) Internacional de Ciências Farmacêuticas FIP. XXI Assembleia geral da F. I. P.</i>	69
<i>Congresso (III) Internacional de Farmacologia</i>	253
<i>Congresso Internacional de Saúde</i>	69
<i>Congresso Mundial de Medicina de Viação</i>	137
<i>Congresso (VII) Panamericano de Farmácia e Bioquímica</i>	134
<i>Congresso da Sociedade de Farmácia do Mediterrâneo Latino</i>	254
<i>Contribuição para o estudo da estabilidade da metoclopramida em preparações farmacêuticas</i>	407
<i>Conversão da desoxicorticosterona em corticosterona. Variações obtidas com os diferentes meios de isolamento das mitocôndrias da supra-renal</i>	457
<i>Corticosterona. Variações obtidas com os diferentes meios de isolamento das mitocôndrias da supra-renal (Conversão da desoxicorticosterona em)</i> ...	457

Cromodacriorreia como método de ensaio biológico de massas para supositórios (Utilização do fenómeno da)	77
Desoxicorticosterona em corticosterona. Variações obtidas com os diferentes meios de isolamento das mitocôndrias de supra-renal (Conversão da)	457
Determinação da razão ADP/O pelo electrodo de Oxigénio	461
Diazotação usando indicador interno e meio de contraste (Doseamento de sulfamidas por)	1
Diferenciação das espécies de estreptococos do grupo D pela acção da lisozima	9
Dignificação da Oficina farmacêutica	344
Disposições Officiais	67 e 249
Ditiazanina como indicador de emprego simultâneo em anidrovolumetria ácida e básica (O iodeto de)	81
Doseamento de sulfamidas em preparações farmacêuticas	404
Doseamento de sulfamidas por diazotação usando indicador interno e meio de contraste	1
Educação Sanitária (Programa Nacional)	143
Educação Sanitária na Era espacial	317
Electrodo de oxigénio (Determinação das razões ADP/O pelo)	461
Ensaio biológico de massas para supositórios (Utilização do fenómeno da cromodacriorreia como método de)	77
Ensaio de friabilidade dos comprimidos	374
Estabilidade da associação da amidofebrina com um novo anti-reumático de síntese (ICI-350) na forma de supositórios	417
Estatuto do Sindicato Nacional dos Farmacêuticos	147
Estreptococos do grupo D pela acção da lisozima (Diferenciação das espécies de)	9
Estudo analítico do cloridrato de pirritoxina	444
Evolução (A) da Farmacognosia	327
Excipiente no fabrico de supositórios (Um método de cálculo da quantidade de)	383
Faculdade de Farmácia do Porto	72
Farmacêutico (O) hospitalar e a Saúde Pública	38
Farmacêuticos trabalhando por conta de outrem (Honorários dos)	321
Farmácia (Medicina e)	85
Farmácia Hospitalar	38, 107 e 206
Farmácia Industrial	37, 105 e 205
Farmácia de Oficina	32, 104 e 203
Farmácia de Oficina (Relações públicas em)	33
Farmacognosia (A evolução da)	327
Fenómeno da cromodacriorreia como método de ensaio biológico de massas para supositórios (Utilização do)	77
Ferro (Absorção intestinal do)	466
Floroglucinol e trimetoxibenzeno em preparações farmacêuticas (Separação, identificação e dosagem do)	394
Friabilidade dos comprimidos (Ensaio de)	374
Grémio Nacional das Farmácias	73
Honorários dos farmacêuticos trabalhando por conta de outrem	321
Hospitais Cíveis de Lisboa (Revisão dos quadros do pessoal dos)	249
Hospitais da Universidade de Coimbra (Revisão dos quadros do pessoal dos)	252
Hospital Escolar de S. João (Revisão dos quadros do pessoal do)	251
Hospital de Santa Maria (Revisão dos quadros do pessoal do)	67
ICI-350, na forma de supositórios (Estabilidade da associação da amidofebrina com um novo anti-reumático de síntese)	417
Inquéritos sobre sanidade relacionados com o meio vital	355
Iodeto (O) de ditiazanina como indicador de emprego simultâneo em anidrovolumetria ácida e básica	81
Jornadas Anuais do Instituto de Química da Nova Zelândia	141
Jornadas da «Europa Médica» em Lisboa	256
Jornadas (I) Farmacêuticas Italianas	259
Jornadas (V) Farmacêuticas Portuguesas	73 e 138
Jornadas (V) Farmacêuticas Portuguesas (Organização)	267
Jornadas (V) Farmacêuticas Portuguesas (Programa)	273
Jornadas Técnicas e Exposição de plásticos e pinturas	256

<i>Lições no Sindicato Nacional dos Farmacêuticos</i>	140
<i>Liozima (Diferenciação das espécies de estreptococos do grupo D pela acção da)</i>	9
<i>Medicamentos Novos</i>	40, 108 e 207
<i>Medicina e Farmácia</i>	85
<i>Metoclopramida em preparações farmacêuticas (Contribuição para o estudo da estabilidade da)</i>	407
<i>Método (Um) de cálculo da quantidade de excipiente no fabrico de supositórios</i>	383
<i>Métodos de doseamento da aceto-hexamida (Características físico-químicas e)</i>	169
<i>Métodos (Os) Instrumentais em análise farmacêutica. III — a) Análise polarográfica do pantenol em preparados multivitamínicos</i>	452
<i>Mitocôndrias da supra-renal (Conversão da desoxicorticosterona em corticosterona. Variações obtidas com os diferentes meios de isolamento das)</i>	457
<i>Momento (O) Farmacêutico</i>	143
<i>Notas de Reportagem (Relato das Sessões e)</i>	277
<i>Noticiário geral</i>	69, 133 e 253
<i>Oficina Farmacêutica (Dignificação da)</i>	344
<i>Pantenol em preparados multivitamínicos (Os métodos instrumentais em análise farmacêutica. III — a) Análise polarográfica do)</i>	452
<i>Perguntas e Respostas</i>	67, 132 e 248
<i>Pesquisa, por via biológica, de substâncias anti-fermentativas nos vinhos</i>	428
<i>Pielonefrite crónica (Aspectos laboratoriais da)</i>	186
<i>Piritioxina (Estudo analítico do cloridrato de)</i>	444
<i>Programa Nacional de Educação Sanitária</i>	143
<i>Quadros do pessoal dos Hospitais Cíveis de Lisboa (Revisão dos)</i>	249
<i>Quadros do pessoal dos Hospitais da Universidade de Coimbra (Revisão dos)</i>	252
<i>Quadros do pessoal do Hospital Escolar de S. João (Revisão dos)</i>	251
<i>Quadros do pessoal do Hospital de Santa Maria (Revisão dos)</i>	67
<i>Razões ADP/O pelo eléctrodo de oxigénio (Determinação das)</i>	461
<i>Relações públicas em farmácia de Oficina</i>	33
<i>Relato das Sessões e Notas de Reportagem</i>	277

Resumos

<i>Análises Bioquímicas</i>	26, 100 e 195
<i>Química Farmacêutica</i>	25 e 194
<i>Tecnologia Farmacêutica</i>	98
<i>Rutina e trioxietilrutina, Separação, identificação e dosagem nos medicamentos</i>	388
<i>Sanidade (Inquéritos sobre) relacionados com o meio vital</i>	355
<i>Saúde Pública (O farmacêutico-hospitalar e a)</i>	38
<i>Separação, Identificação e dosagem do floroglucínol e trimetoxibenzeno em preparações farmacêuticas</i>	394
<i>Silicones (Os) e sua aplicação no campo farmacêutico</i>	12
<i>Substâncias anti-fermentativas nos vinhos (Pesquisa por via biológica de)</i>	428
<i>Sulfamidas em preparações farmacêuticas (Doseamento de)</i>	404
<i>Sulfamidas por diazotação usando indicador interno e meio de contraste (Doseamento de)</i>	1
<i>Supositórios (Um método de cálculo da quantidade de excipiente no fabrico de)</i>	383
<i>Supositórios (Utilização do fenómeno da cromodacriorreia como método de ensaio biológico de massas para)</i>	77
<i>Técnica (Uma) cromatográfica expedita de aplicação na extensão agrária para detecção do Carbaril (Sevin)</i>	175
<i>Trimetoxibenzeno em preparações farmacêuticas (Separação, identificação e dosagem do floroglucínol e)</i>	394
<i>Trioxietilrutina, Separação, identificação e dosagem nos medicamentos (Rutina e)</i>	388
<i>Utilização do fenómeno da cromodacriorreia como método de ensaio biológico de massas para supositórios</i>	77
<i>Vinhos (Pesquisa por via biológica de substâncias anti-fermentativas nos) ...</i>	428
<i>Vitamina B₁, Preparação e verificação da cedência «in vivo» e «in vitro», (Comprimidos de acção prolongada de)</i>	420

2) AUTORES

ALBUQUERQUE (A.)	374 e	383
BALTAZAR (J. A.)		169
BARROS E CUNHA (G.)		321
CARDOSO (M. Manuela)	383 e	420
CARVALHO (R.)		355
CAVACO (A. C.)	1 e	404
CORREIA ALVES (A.)		327
COSTA (A.)		77
CRUZ (Isabel M.)		457
DIAS AGUDO (M. Helena)		38
DUARTE RODRIGUES (L.)	388 e	394
FALCÃO (Rui F.)	1, 81 e	404
FERREIRA BRAGA (M. Margarida)		169
FERREIRA LEITÃO (E.)		417
FIGUEIREDO DE SOUSA (J. C.)		420
GASPAR (Ermelinda V.)		466
GUERRA (F. Carvalho)	457 e	461
LUZ CLARA (M. Manuela)		38
MARCONDES (R. S.)		317
MARIANO PEREIRA (J.)		175
MARQUES GOMES (J. V.)		428
MATTA (Gerardo)	407, 444 e	452
NOBRE SEQUEIRA (M. L.)		417
NOGUEIRA PRISTA (L.)		420
PAIVA (M. Quitéria)		77
PAIVA ALVES (M. Amélia)	388 e	394
PEREIRA JR. (A.)		344
PINHO DE BRÓJO (A.)		417
RAMOS MORGADO (R.)		420
RIBEIRO LOPES (J. S. M.)		33
RODRIGUES FILIPE (M. Avelina)		363
SAMPAIO RAMOS (M. Helena)		9
SANTOS SILVA (H.)		186
SILVA (M. Júlia)		407
SILVA DIAS (M. do Sacramento C. Grilo)		12
SIMÕES LOPES (E.)	444 e	452
TAVARES (M. Irene)		374
VAZ DE OLIVEIRA (M. Margarida F.)		428
VELOSO (Dulce C. P.)		461
XAVIER MORATO (M. J.)		85



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

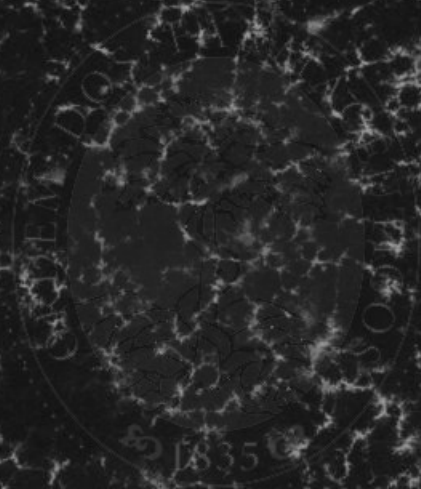


Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

1



Le librerie di via Po 12, Torino

1959

