
REVISTA PORTUGUESA DE FARMÁCIA

VOL. XXII • 1972 • JANEIRO-MARÇO • N.º 1



SUMÁRIO

EDITORIAIS..... 1/2

TRABALHOS ORIGINAIS

- ✦ *Estudos sobre fluorescência*, por Dâmaso José da Silva Gomes 3/29
- ✦ *Determinação do colesterol em análises clínicas*, por C. Palla Garcia 30/59

REVISÕES DE CONJUNTO

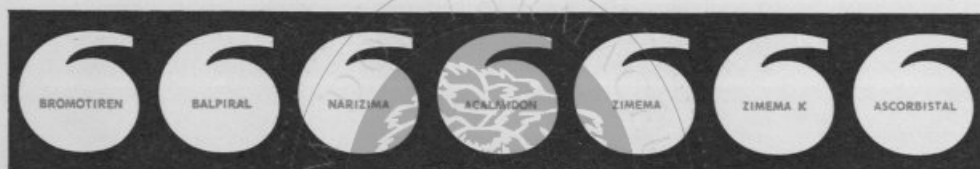
- ✦ *Enzimas e acção enzimática*, por José Gabriel R. da Silva Gomes 60/84
- ✦ *Ácidos carboxilílicos e os seus ésteres*, por Hígualdo José Chaves das Neves 85/105

ECOS E FACTOS

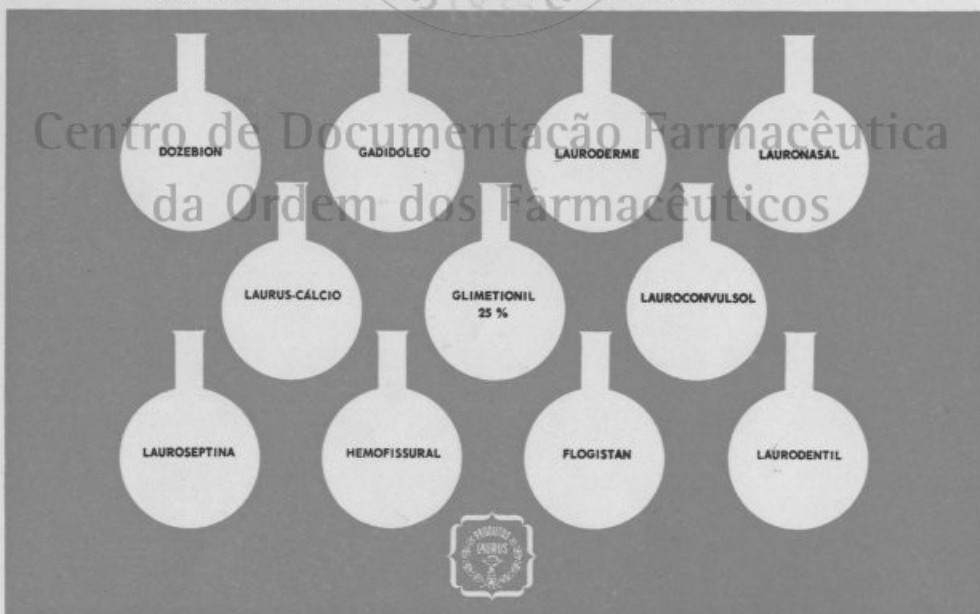
- ✦ *Divulgando* 106/109
- ✦ *Noticiando* 104

BIBLIOGRAFIA 111/114

FARMOQUÍMICA BALDACCI, S.A.R.L.
(FARBASA)



RUA DUARTE GALVÃO, 44 LISBOA 4 - TELEF. 783031 780719



Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos



activarol

AMPOLAS BEBÍVEIS

TÓNICO BIOLÓGICO ISENTO
DE EXCITANTES ARTIFICIAIS

COMBATE A FADIGA E A ASTENIA
DEPOIS DAS DOENÇAS
INFECCIOSAS



COMPOSIÇÃO

Hematoporfirina	0,006 g	Glicerina	1 g
Glycocola	0,500 g	Açúcar	1 g
Extracto concentrado de Fígado.	0,020 g	Álcool a 95°	0,900 g
Extracto aminado de leveduras	0,100 g	Tintura de essência de laranja	0,100 g
Citrato de sódio.	0,300 g	Água destilada Q. S. para um tubo fechado de 10 ml	

Centro de Documentação Farmacêutica

INDICAÇÕES

ASTENIA — ANOREXIA — EMAGRECIMENTO
ESFORÇOS E EXCESSOS DE TRABALHO (físico e intelectual)
ESTADOS INFECCIOSOS — CONVALESCENÇAS
ESTADOS DE DEPRESSÃO (física ou psíquica)
ANEMIA CARENCIAL

APRESENTAÇÃO:

Caixa de 24 ampolas bebíveis de 10 ml

POSOLOGIA

Adultos: 2 a 3 ampolas por dia
Crianças de mais de 6 anos: 1 a 2 ampolas por dia



LABORATÓRIOS AZEVEDOS

MEDICAMENTOS DESDE 1775

produto original LAB. A. ROLLAND



Paris — França



Boehringer Ingelheim

Especialidades farmacêuticas

Adumbran

Estabilizador psicovegetativo

Aleudrin

Broncodilatador e
Ritmizante cardíaco

Alupent

Broncodilatador com efeito duradouro e
Ritmizante cardíaco

Bisolvon

Antidiscrínico brônquico

Buscopan

Espasmolítico selectivo

Buscopan compositum

Espasmo-analgésico potente e selectivo

Catapresan

Hipotensor de regulação central

Cholipin

Colepoiético e espasmolítico

Cohortan

Dermotópico polivalente

Dulcolax

Laxante por contacto

Effortil

Analéptico cardiovascular de acção
intensa

Finalgon

Hiperemiante percutâneo

Persantin

Persantin 75

Metabolizante do miocárdio,
Activador da rede colateral coronária e
Antiagregante plaquetar

Preludin

Moderador do apetite

Rhinospray

Descongestionante nasal

Silomat

Antitússico específico

Sympatol

Analéptico periférico normotensor

Vascularit-Dépôt

Angioactivador cerebral e periférico geral
de acção depósito

Vasculat

Angioactivador cerebral e periférico geral

Vilescon

Ergotónico

Visadron

Colírio descongestionante

Representantes em Portugal:

Unilfarma

União Internacional de
Laboratórios Farmacêuticos, Lda.

Departamento fabril:
Zona Industrial dos Olivais — Lisboa 6

Administração:
Av. António Augusto de Aguiar, 104, 1.º — Lisboa 1

Delegação no Norte:
Rua João das Regras, 120 — Porto

REVISTA PORTUGUESA DE FARMÁCIA

Publicação trimestral

Director. A. A. PALLA CARREIRO — Presidente da Direcção

Director-Adjunto: A. SILVA SANTOS

Edição e Propriedade de

Sindicato Nacional dos Farmacêuticos — Sociedade Farmacêutica Lusitana

(Membro efectivo da «Fédération Internationale Pharmaceutique»)

Redacção e Administração: Rua Sociedade Farmacêutica, 18 - Tel. 4 14 33 - Lisboa, 1

Composto e impresso nos Serviços Gráficos da LIGA DOS COMBATENTES — Lisboa

Corpo Redactorial

J. Almeida Baltazar; A. Correia Ralha; M. H. Dias Agudo; M. M. Ferreira Braga; M. A. Figueiredo; A. Marques Leal; A. Moz Teixeira; L. Nogueira Prista; A. Pereira; A. Perquilhas Teixeira; O. Pinto; M. B. Ramos Lopes; H. Santos Silva; L. Silva Carvalho; Dâmaso Gomes; A. Silva Santos; C. Silveira; L. Sousa Dias; J. F. Vale Serrano; Roque da Silva; Proença da Cunha; L. Silveira Godinho; M. Vieira da Silva; L. Matias Torres; J. António Polónia; E. Simões Lopes; Dinis Rosa; Lobato da Fonseca

VOL. XXII • 1972

JANEIRO - MARÇO • N.º 1

EDITORIAIS

1.º PROGRAMA DE CONTROLO DE QUALIDADE EM QUÍMICA CLÍNICA

O aumento cada vez maior do número de análises solicitadas aos laboratórios de análises clínicas exige maior responsabilidade aos seus técnicos.

O controlo de qualidade inter-laboratórios e intra-laboratórios é uma necessidade da hora presente. Controlo de reagentes, controlo de métodos, controlo de aparelhos, etc., tem como finalidade única a precisão dos resultados.

Todos os países da Europa já realizaram programas de controlo de qualidade à excepção de Portugal. O Grupo de Trabalho dos químico-farmacêuticos e especialistas em análises químico biológicas (análises clínicas) do distrito de Santarém, que há muitos anos tem organizado programas de índole diversa relacionados com as análises clínicas, o penúltimo dos quais a nível nacional em Tomar, vai promover este ano o 1.º Programa de Controlo de Qualidade em Química Clínica no nosso País.

Esse programa tem a colaboração dos laboratórios DADE ⁽¹⁾ que porá à disposição soros liofilizados com valores normais e anormais de modo que o controlo de qualidade seja uma realidade entre nós.

⁽¹⁾ A firma LISFARMA (Secção Sangue e Análises) Rua Pedro Nunes, 45-1.º em Lisboa-1, como representante dos Laboratórios DADE, recebe as inscrições para este programa.

Colegas de outros países estão interessados no nosso programa tendo já sido solicitado ao seu promotor um relatório das conclusões.

Uma vez efectuadas as análises cujos doseamentos incidem sobre glicose, ureia, colesterol, proteínas totais, transaminases e fostatase alcalina, os resultados (confidenciais) são depois apreciados em termos estatísticos, pelo que se promoverá uma reunião nacional. Aproveitar-se-á esta reunião para debater temas relacionados com controlo de qualidade tais como reconstituição e preparação de soros liofilizados para controlo, semi-automatização em análises clínicas, estatística, etc.

A participação de cada um é um problema de consciência, desejamos somente contribuir para que os resultados analíticos nos laboratórios de análises clínicas sejam rigorosos.

Deste modo é inútil salientar o valor da participação de todos os colegas analistas no nosso programa.

A F. I. P. PRECISA DE VÓS

A colaboração entre países, quer se considerem os aspectos políticos, económicos, religiosos ou farmacêuticos, realiza-se cada vez mais sob os auspícios de organizações internacionais. Algumas dessas associações são de carácter não governamental tal como sucede com a FIP que, nascida em 1912 com 213 membros possui actualmente cerca de 3300.

As organizações internacionais de nível não estatal, são hoje chamadas a desempenhar um papel importante na mundialização dos interesses humanos. A Federação Internacional Farmacêutica ocupa na constelação dos organismos internacionais uma posição privilegiada que se fundamenta numa experiência de 60 anos e no esforço de 50 sociedades nacionais, entre as quais se encontra o nosso Organismo Sindical.

A FIP está estruturada para defender os interesses dos farmacêuticos à escala mundial não admirando, portanto, o aumento individual dos seus filiados e daqueles que participam nas suas manifestações, nomeadamente no que diz respeito aos Congressos Internacionais que reúnem anualmente, durante uma semana, cerca de 2000 colegas oriundos de mais de meia centena de distintos países.

Verificada a amplitude da organização é de esperar que os farmacêuticos espalhados pelo globo, nomeadamente os do Império Português não fiquem indiferentes ao apelo de uma adesão maciça tendente a atingir os 10 000 membros o que daria à FIP ⁽¹⁾ uma força difícil de prever.

⁽¹⁾ Para quaisquer informações dirija-se ao Secretariado da F. I. P. — Alexanderstraat 11, Haia — Holanda.

TRABALHOS ORIGINAIS

ESTUDOS SOBRE FLUORESCÊNCIA

VI. VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DAS SOLUÇÕES DE **CROMOTROPATO DISSÓDICO** COM A CONCENTRAÇÃO E O pH DO MEIO

DAMASO JOSÉ DA SILVA GOMES (*)

*Licenciado em Ciências Físico-Químicas e Doutor em Farmácia
Prof. do 3.º Grupo de Cadeiras da Escola Naval
Equiparado a Investigador do INII*

1. A utilização dos indicadores corados convencionais na titulimetria ácido-base, deixa de ser possível, ou torna-se difícil e pouco precisa, quando a substância a dosear se encontra num meio turvo, opaco ou corado, como sucede especificamente no caso do leite, dos sumos e concentrados de frutas, ou das tintas industriais.

A resolução da dificuldade tem sido encarada pelo uso de métodos variados, e diversos investigadores, como VOLMAR y CLAVERA [1], VOLMAR et WIDDER [2], ERDEY e colaboradores [3, 4, 5, 6], entre outros [7, 8, 9], ensaiaram, para este fim, o uso das técnicas correntes em análise volumétrica, mas utilizando indicadores fluorescentes [10] em vez dos indicadores corados, para determinar o ponto de equivalência no decurso da titulimetria.

Referências ao uso de fluorígenos, isto é, de substâncias capazes de devolver na obscuridade, sob a forma de radiações visíveis, a energia de excitação previamente recebida de uma fonte de radiações, geralmente do ultra-violeta próximo — como é o caso da Luz de Wood, cujo comprimento de onda é de 365 nm — encontram-se em vários autores, como sejam KOLTHOFF [11, 12], CHARLOT [13], TOMICEK [14], RADLEY and GRANT [15], KONSTANTINOVA-SHLEZINGER [16], PRINGSHEIM [17] e outros [18, 19, 20].

Nem todos os fluorígenos são susceptíveis de serem usados como indicadores fluorescentes, cabendo esta qualidade àqueles que, dentro

(*) *Endereço actual:* Instituto Nacional de Investigação Industrial, Rua Garcia de Orta, 68-1.º, LISBOA-2, PORTUGAL.

de um intervalo da ordem de 2 unidades de pH, ou menos, sofram mudança brusca da sua intensidade de fluorescência, ou apresentem mudança nítida da cor das radiações de fluorescência.

O uso dos indicadores fluorescentes, carece, desta forma, de um estudo prévio, relativo a cada fluorigénio, destinado a avaliar do modo como as suas soluções se comportam quando varia o pH do meio onde se encontra [21].

Tal como sucede para os indicadores corados convencionais, também os manuais de Análise Química, e muito especialmente os que se dedicam à Análise Fluorimétrica, referem os limites de pH dentro dos quais se processam as variações de fluorescência que estão na origem da sua utilização como indicadores na titulimetria ácido-base.

Tabelas dessa natureza podem ser consultadas em LANGE [22], TOMICEK [23], RADLEY and GRANT [24] e outros [25, 26, 27, 28, 29], mas não encontramos, em nenhum dos autores, referência concreta e pormenorizada ao modo como foram obtidos os valores apresentados, e parece mesmo que seja de pôr uma certa desconfiança no rigor desses valores, porquanto KONSTANTINOVA-SHLEZINGER [30], que também apresenta uma dessas tabelas, nos diz: *The information in the table should be regarded as approximate; it summarizes the observations made by different workers who used them for certain practical purposes and cannot pretend to accuracy, as will be clear from the discussion which follows. This explains the wide color change intervals given for some of the indicators.*

Em RADLEY and GRANT [31] parece-nos ver aflorar a mesma dúvida, embora de modo menos categórico, e o confronto das respectivas opiniões, fez-nos pensar que seria de interesse empreender uma investigação sistemática com o fim de obter dados, tão precisos quanto possível, sobre o comportamento de diversos fluorigénios quando varia o pH do meio em que se encontram.

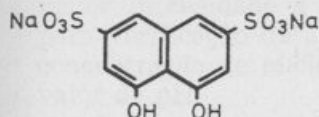
O presente trabalho insere-se numa série de investigações que levámos a cabo com essa finalidade, e, das consultas bibliográficas a que procedemos, foi-nos grato verificar que nos não encontramos isolados neste campo, facto que de resto ressalta claramente da consulta aos livros de PASSWATER [32, 33].

A nossa investigação foi conduzida no sentido de, para cada fluorigénio, considerado como possível indicador fluorescente, conhecer:

- a) o comportamento do poder fluorescente das suas soluções em relação às prescrições da Lei de Perrin [34, 35, 36];
- b) a concentração do fluorigénio para a qual a intensidade da fluorescência emitida é máxima;
- c) a estabilidade das soluções do fluorigénio, de uso suposto possível como indicador, ao longo do tempo;
- d) o modo como varia a intensidade das radiações de fluorescência emitidas, quando varia o pH do meio.

Em trabalhos anteriores [37, 38, 39, 40, 41, 42] descrevemos com pormenor o protocolo elaborado para a sequência das investigações a que procedemos, pelo que nos não iremos repetir, remetendo o leitor porventura interessado à consulta das publicações referidas.

2. Os ensaios realizados incidiram desta vez sobre o sal dissódico do ácido cromotrópico; 4,5-dihidroxi-2,7-naftalenodisulfonato de sódio, ou cromotropato dissódico, que cristaliza com duas moléculas de água sob a forma de agulhas brancas, ou de escamas, com a fórmula $C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$ [43, 44].



Utilizámos nas experiências o *cromotropato dissódico* Merck, referência de catálogo 2498, e identificamos o

produto usado, em virtude de ter chegado ao nosso conhecimento, por comunicação oral, que investigações sobre fluorescência conduzidas noutros domínios, levaram a resultados que variavam com a origem do produto, ou com o lote de fabrico.

As experiências foram conduzidas, de acordo com uma sugestão de RADLEY and GRANT [45], utilizando meios tamponados de pH conhecido, os quais foram obtidos, para valores inteiros de pH, por diluição com água destilada recentemente fervida de ampolas do tipo das do *titrisol* (Merk) ou *normex* (Carlo Erba), e para valores intermediários com produtos químicos *p.anal.* ou equivalentes, e água destilada recentemente fervida, de acordo com as formulações adequadas que se encontram na literatura [46, 47, 48, 49].

Para o estudo da estabilidade das soluções, utilizámos como padrão uma solução de sulfato de quinino [50, 51, 52, 53, 54] em ácido sulfúrico decinormal, de concentração que produzisse uma intensidade de fluorescência da ordem de grandeza da da solução do fluorigénio em ensaio.

Conquanto vissemos referido na literatura que as soluções de sulfato de quinino em ácido sulfúrico são estáveis, preparámos, ao longo do tempo que duraram os ensaios, soluções frescas cuja intensidade de fluorescência confrontámos com a da solução de reserva.

Os resultados obtidos mostraram que a intensidade de fluorescência da solução de reserva não sofreu declínio durante o tempo dos ensaios, apresentando estabilidade que podemos qualificar de perfeita.

Utilizámos nas experiências, como habitualmente o temos feito, um fotofluorímetro *Coleman* de filtros [55] equipado com o filtro primário 12-225 (B-1-S) de vidro Corning n.º 5874, permeável para comprimentos de onda de 365 nm, e com o filtro secundário 14-218 (PC-8) de vidro Corning n.º 3060, permeável para comprimentos de onda compreendidos entre 405 e 750 nm, segundo as indicações do fabricante [56].

CROMOTROPATO DISSÓDICO

Solvente: água destilada Concentração: 5 % p/v
 Número de gotas da solução por mililitro: 21
 Meio tamponado de pH=9,0
 Volume de tampão de cada tubo de fotofluorímetro: 8 ml
 Número de gotas na concentração de eficiência máxima: 3,5
 Concentração do fluorigénio no tampão:

- a) — em gramas por litro: 1,041 g.l⁻¹
 b) — em moles por litro: 2,6 × 10⁻³ M.l⁻¹

Gotas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1ª série	20,0	28,8	29,9	29,8	28,8	26,2	23,9	21,3	20,0	18,4	18,0	17,5
2ª série	20,0	28,7	29,8	29,9	28,6	26,1	23,6	21,6	19,6	18,7	17,8	17,5
3ª série	20,0	28,5	29,9	30,2	28,7	26,0	23,1	21,9	20,0	18,6	18,0	17,6
4ª série	20,0	28,7	29,9	30,2	28,5	26,1	23,6	21,5	19,9	18,6	18,1	17,4
5ª série	20,0	28,8	30,0	30,0	28,3	26,3	23,5	21,0	19,5	18,5	18,2	17,3
médias	20,0	28,7	29,9	30,0	28,4	26,1	23,5	21,4	19,8	18,5	18,0	17,4

Quadro 1

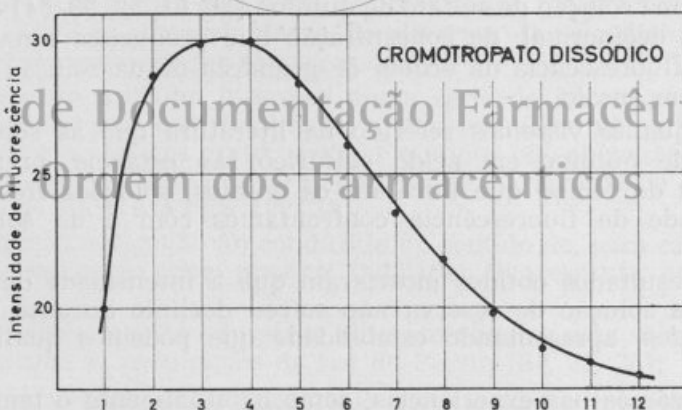


Fig. 1

Variação da intensidade de fluorescência das soluções de cromotropato dissódico com a concentração

3. Preparámos uma solução de *cromotropato dissódico* em água destilada, e juntámos um mesmo volume da solução a 8 ml de soluções tampão, contidas em tudos de fotofluorímetro, escalonadas por valores de uma unidade de pH desde pH=2,0 até pH=13,0, e iluminámos o conjunto com uma lanterna portátil de Luz de Wood, a fim de detectar o pH do meio em que se verificava maior intensidade de fluorescência.

A observação do conjunto mostrou que as soluções de *cromotropato dissódico* apresentam fluorescência *anil-violeta forte* com a sua maior intensidade a pH=9,0, pelo que realizámos as experiências para verificação do acordo com a Lei de Perrin, e determinação da concentração de eficiência máxima, em meios tamponados com este valor de pH.

Dispusemos num suporte 12 tubos de fotofluorímetro contendo cada um 8 ml de tampão de pH=9,0, adicionámos-lhe por ordem I a XII gotas de uma solução aquosa de *cromotropato dissódico* de concentração conhecida, e determinámos as intensidades relativas de fluorescência nos diferentes tubos.

Repetimos as experiências com concentrações diferentes, procurando obter uma solução para a qual a intensidade de fluorescência máxima fosse obtida pela adição de, entre II e V gotas dessa solução.

O resultado pretendido ocorreu com a solução de *cromotropato dissódico* em água a 5% p/v.

Tomámos então para referência a fluorescência do tubo a que havíamos adicionado I gota, e fizemos corresponder-lhe arbitrariamente a ponto 20,0 da escala do fotofluorímetro, determinando as intensidades de fluorescência relativas nos diferentes tubos.

Repetimos por 5 vezes as leituras, calculámos as médias dos valores obtidos, e representámos graficamente os resultados.

Os valores lidos, as respectivas médias, e a representação gráfica da intensidade de fluorescência com a concentração, constituem o Quadro I e a Fig. 1 incluídos no texto, e o seu exame, mostra que as soluções de *cromotropato dissódico* se comportam de acordo com as cominações da Lei de Perrin, e que, em meio tamponado de pH=9,0 se obtém a intensidade máxima de fluorescência, quando a 8 ml de tampão se adicionam 3,5 gotas (resultado obtido por extrapolação gráfica) de uma solução aquosa de *cromotropato dissódico* a 5% p/v.

Desprezando o volume das gotas da solução de *cromotropato dissódico* adicionais ao tampão, verifica-se que a fluorescência máxima se obtém para a concentração aproximada de 1,041 gramas por litro, o que, considerando que a substância usada foi o sal dihidratado de peso molecular 400,30, corresponde a $2,6 \times 10^{-3}$ moles por litro.

Um exame do gráfico parece permitir afirmar que, a ser viável o emprego do *cromotropato dissódico* como indicador fluorescente, deverão ser utilizadas II a V gotas da sua solução aquosa a 5% p/v, para uma tomada de ensaio de 8 a 10 ml.

CROMOTROPATO DISSÓDICO

Solvente: água destilada

Concentração: 5 % p/v

Meio tamponado de pH=9,0

Volume de tampão em cada tubo de fotofluorímetro: 8 ml

Gotas de solução adicionadas a cada tubo: III

Padrão: Solução de sulfato de quinino a 10 mg por litro em H₂SO₄ N/10

Determinações realizadas semanalmente durante 12 semanas

semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1ª série	79,5	47,3	27,8	17,0	7,1	4,5	2,5	1,6	0,8	0,0	0,0	0,0
2ª série	78,8	47,1	27,6	17,0	7,2	4,3	2,6	1,6	0,8	0,0	0,0	0,0
3ª série	79,2	46,9	27,0	16,9	7,2	4,2	2,5	1,5	0,8	0,0	0,0	0,0
4ª série	79,6	46,8	27,2	17,0	7,0	4,2	2,7	1,3	0,8	0,0	0,0	0,0
5ª série	79,5	47,0	27,4	17,1	7,0	4,3	2,8	1,5	0,8	0,0	0,0	0,0
médias	79,3	47,2	27,4	17,0	7,1	4,3	2,6	1,5	0,8	0,0	0,0	0,0

Quadro 2

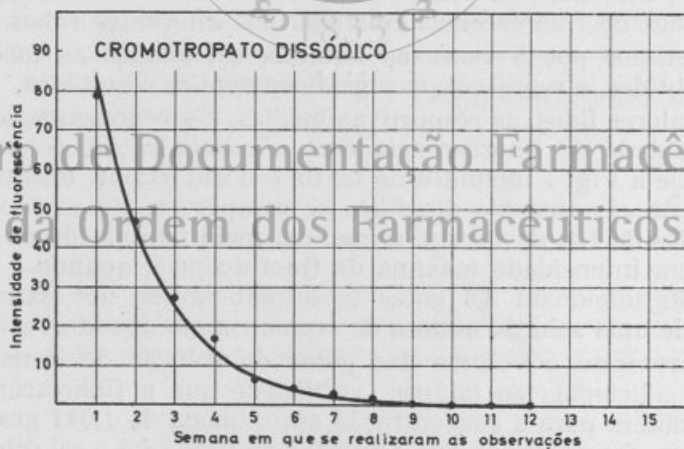


Fig. 2

Estabilidade das soluções de *cromotropato dissódico* com o tempo

4. Para determinar a estabilidade das soluções de *cromotropato dissódico* preparámos uma solução aquosa a 5 % p/v, e guardámo-la num frasco de vidro âmbar com rolha esmerilhada, durante o tempo que demoraram os ensaios.

Semanalmente e a intervalos regulares, comparámos a intensidade de fluorescência da solução que se obtém adicionando III gotas da solução de reserva de *cromotropato dissódico* a 8 ml de tampão de pH = 9,0, com o de uma solução de sulfato de quinino a 10 miligramas por litro em ácido sulfúrico decinormal, que, em ensaios prévios, mostrou ser de concentração conveniente.

Fizemos, de modo arbitrário, corresponder o ponto 90,0 da escala do fotofluorímetro à fluorescência da solução de sulfato de quinino e determinámos em relação a esse valor a intensidade de fluorescência das soluções em estudo.

Fizemos as determinações durante 12 semanas consecutivas, e interrompemo-las a partir de então, porquanto, a partir da 7.^a semana a fluorescência manifestada passou a não ser de considerar, ou mesmo a ser inexistente.

Fizemos de cada vez 5 determinações, calculámos as médias dos valores obtidos, e representámos graficamente os resultados, que constituem, uns e outro, o Quadro 2 e a Figura 2.

O exame do gráfico mostra que as soluções aquosas de *cromotropato dissódico* a 5 % p/v não são estáveis, reduzindo-se a sua intensidade de fluorescência a cerca de metade do fim de 1 semana, o que permite afirmar que, a ser de considerar o seu uso como indicador fluorescente, se devem empregar sempre soluções acabadas de preparar.

5. Para estudar a variação da intensidade de fluorescência das soluções de *cromotropato dissódico* em função do pH do meio, preparámos, de acordo com o protocolo estabelecido, soluções tampão correspondentes a unidades inteiras de pH, por diluição com água destilada recentemente fervida de ampolas do tipo das de *titrisol* (Merck), e preparámos soluções tampão correspondentes aos valores intermédios com produtos químicos puros (*p. anal.* ou *A. R.*) e água destilada recentemente fervida, de modo a cobrir o intervalo compreendido entre pH = 2,0 e pH = 13,0.

Tomámos 8 ml de cada tampão para cada um de 23 tubos de fotofluorímetro que dispusemos por ordem num suporte, e juntámos a cada tubo III gotas de uma solução aquosa de *cromotropato dissódico* a 5 % p/v.

Num exame prévio observámos que a intensidade máxima de fluorescência se verificava para valores de pH superiores a 8,0 e inferiores a 10,0, com valores sensivelmente iguais no intervalo, pelo que tomámos para ponto de referência a fluorescência em tampão de pH = 9,0, a que fizemos corresponder arbitrariamente o ponto 90,0 da escala do fotofluorímetro.

CROMOTROPATO DISSÓDICO

Sinopse dos resultados apresentados em Apêndice

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
1º determ.	10,9	15,9	24,3	39,2	37,5	16,0	7,2	4,9	4,9	5,0	5,0
2º determ.	11,6	15,1	25,7	41,8	36,4	12,4	7,0	6,0	5,9	5,8	5,2
3º determ.	9,5	12,6	20,6	35,7	33,6	13,8	7,2	5,6	5,5	5,1	6,0
4º determ.	12,3	17,7	28,0	41,5	36,1	15,3	8,6	6,3	6,3	6,0	6,0
5º determ.	9,8	13,9	22,6	38,1	37,5	16,6	7,2	5,6	5,3	5,2	5,4
6º determ.	10,7	15,4	25,9	39,5	37,7	16,0	7,5	6,0	5,6	5,0	5,2
7º determ.	11,0	15,5	24,9	38,8	36,0	18,9	8,2	6,0	5,6	5,6	5,5
8º determ.	10,2	14,1	23,2	37,7	35,3	18,2	7,4	5,3	5,1	5,0	5,0
médias	10,7	15,0	24,8	39,0	36,2	15,9	7,5	5,7	5,5	5,3	5,4

pH	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1º	5,0	70,2	90,0	90,0	90,0	75,0	74,9	4,4	4,8	5,1	6,0	4,6
2º	5,7	73,6	90,0	91,1	88,7	68,4	59,4	7,4	7,4	8,3	6,1	4,9
3º	7,6	63,8	90,0	88,5	85,1	63,4	57,4	7,4	7,3	7,8	6,4	5,3
4º	6,0	70,2	90,0	89,6	87,8	68,9	69,7	7,5	8,7	8,6	8,0	6,0
5º	5,5	68,2	90,0	89,8	87,5	73,9	65,1	7,0	6,9	6,7	5,2	4,9
6º	5,2	69,7	90,0	90,2	91,5	75,8	74,0	5,4	6,9	7,0	6,4	4,9
7º	6,0	68,6	90,0	92,7	91,0	71,1	64,6	6,1	6,7	6,8	6,5	5,1
8º	6,1	67,9	90,0	92,8	88,7	69,7	66,1	5,5	5,9	6,1	5,8	4,5
m.	5,9	69,0	90,0	90,6	88,8	70,8	66,4	6,3	6,8	7,0	6,3	5,0

Quadro 3

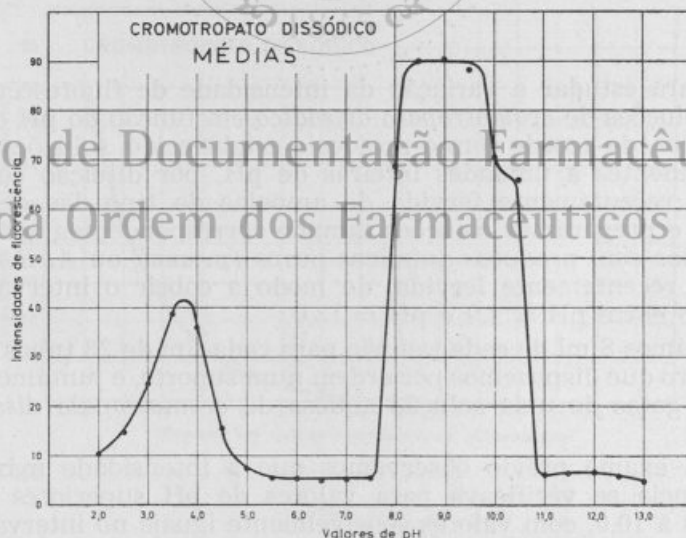


Fig. 3

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio

Realizámos 5 séries de leituras, calculámos as respectivas médias, e representámos grãficamente os resultados, repetindo todas as operações com novos tampões e novas soluções do fluorigénio até prefazer um total de 8 determinações.

Os resultados obtidos encontram-se em Apêndice, assim como as respectivas representações gráficas, constituindo os Quadros e Figuras 5 a 12.

Calculámos as médias dos resultados finais das 8 determinações e representámos grãficamente os valores obtidos, que acompanham o texto constituindo o Quadro 4 e a Figura 4.

O exame dos resultados, aliado à observação directa, mostra que as soluções de *cromotropato dissódico* apresentam um comportamento bastante insólito, quando varia o pH do meio.

Na realidade, até pH = 2,5 a fluorescência emitida é muito fraca e de cor azul pálido; de pH = 2,5 até pH = 4,0 a fluorescência aumenta e adquire uma tonalidade anilada que decai a valores muito fracos entre pH = 5,0 e pH = 7,5; entre pH = 7,5 e pH = 8,5 manifesta-se um aumento brusco da intensidade de fluorescência, que adquire tonalidade anil-violeta forte, mantendo-se a nível constante até pH = 9,5, para decair rapidamente entre este valor e pH = 11,0 e se manter a um nível de intensidade muito baixo, com leve coloração anil-violeta, até pH = 13,0.

As soluções de *cromotropato dissódico* apresentam, como se vê, um comportamento bastante complexo, pelo que a sua utilização como indicador fluorescente nos não parece de aconselhar.

O aproveitamento do salto de fluorescência que se observa entre pH = 7,5 e pH = 8,5 vem prejudicado, para efeitos da sua apreciação, pela existência do máximo de fluorescência que aparece nas vizinhanças de pH = 3,7; o outro salto de fluorescência, que se processa entre pH = 9,5 e pH = 11,0, perfeitamente nítido, será mais fácil de detectar quando o pH do meio diminui.

Como se torna necessário que a viragem do indicador se situe entre pH = 11,0 e pH = 9,5, a aplicação parece-nos ficar muito reduzida, pelo que, no nosso entender, o seu uso não traz quaisquer vantagens.

da Ordem dos Farmacêuticos

6. Nenhum dos autores habitualmente consultados faz menção do *cromotropato dissódico* como indicador fluorescente, encontrando-se referida, não obstante, a utilização do ácido cromotrópico, pelo menos em RADLEY and GRANT [57], TOMICEK [58], DE MENT [59], KONSTANTINOVA-SHLEZINGER [60] e DÉRI-BÉRÉ [61].

As informações dos 3 primeiros autores são idênticas, abonando-se os dois primeiros na mesma fonte (*passa de não fluorescente a azul entre pH = 3,5 e pH = 4,5*); as dos dois últimos são diferentes destas e iguais entre si (*passa de não fluorescente a azul entre pH = 6,0 e pH = 7,0*), mas nenhum abona a sua afirmação.

Consultámos os catálogos de produtos químicos de 14 dos mais importantes fabricantes de produtos químicos para laboratório, fize-

mos consultas, e não conseguimos obter *ácido cromotrópico*, o que nos levou a ensaiar a aptidão do *cromotropato dissódico*, referido em geral nos catálogos como «ácido cromotrópico, sal de sódio».

Pensámos que o produto a que se referem os autores citados, pudesse ser o que encontrámos referido nos catálogos, e único que conseguimos obter.

O confronto entre os resultados a que chegámos e os que vimos referidos na literatura, não aparenta semelhança, se exceptuarmos a da cor das radiações de fluorescência, sempre difícil de apreciar à vista; deste facto encontramos leve consolo, ao verificar que os autores que se referem ao comportamento das soluções de *ácido cromotrópico* não apresentam unanimidade de opinião.

De qualquer forma, presumimos que a substância utilizada não tenha sido a mesma nos diferentes casos, e pensamos que haveria interesse em ensaiar o *ácido cromotrópico*, para se poder confrontar o comportamento das suas soluções, com o das soluções do seu sal dissódico, que foi objecto do presente trabalho.

7. O exame do gráfico que traduz a variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o tempo, sugeriu-nos a ideia de que o declínio da sua actividade fluorígenica se processasse de acordo com a equação cinética das reacções de 1.^a ordem [62, 63, 64, 65].

Para verificar se assim é, considerámos a equação correspondente aos fenómenos deste tipo

$$\phi = \phi_0 \exp(-kt) \quad 1)$$

que se pode escrever

$$\phi_0/\phi = \exp(kt) \quad 2)$$

ou

$$\log(\phi_0/\phi) = kt \log e \quad 3)$$

e, fazendo $k' = k \log e$

$$\log(\phi_0/\phi) = k't \quad 4)$$

em que ϕ_0 representa a intensidade inicial de fluorescência das soluções, ϕ a intensidade de fluorescência decorrido o tempo t e e é a base do sistema de logaritmos neperianos.

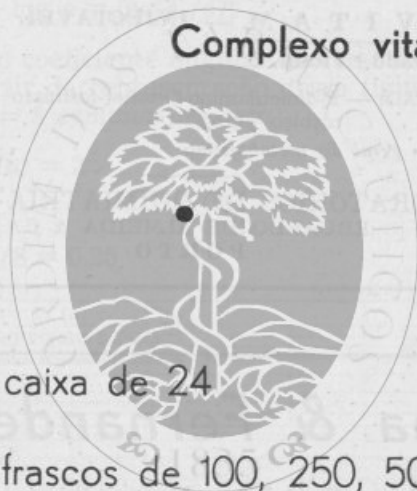
Calculámos os quocientes da intensidade de fluorescência da solução fresca de *cromotropato dissódico* pelos respectivos valores ao fim de 1, 2, 3, ... semanas, e representámos gráficamente, em papel semi-logarítmico, a variação de $\log(\phi_0/\phi)$ em função do tempo decorrido, expresso em semanas.

Fosfo-Glutiron

Ácido glutâmico (sal sódico)

Fósforo orgânico

Complexo vitamínico B



AMPOLAS: caixa de 24

COMPRIMIDOS: frascos de 100, 250, 500 e 1000

GRANULADO: frasco de 100 g.

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

LABORATÓRIO SAÚDE, LDA.

RUA DE SANTO ANTÓNIO À ESTRELA, 44 - LISBOA

COLEOCLINOL — GRANULADO

Estimulante Hepato-Biliar

COMPOSIÇÃO: — Princípio activo das folhas da kinkeliba — Ácido dehidrocólico Hexametenatetramina — Peptona de Witte — Sulfato de magnésio.

Colecistoquinético — Colagogo — Colofluidificante

BELAGASTRINA — PÓ

Hipercloridria — Gastralgias

COMPOSIÇÃO: — Salicilato de bismuto — Carbonato de cálcio — Óxido de magnésio — Hidrato alumínio coloidal — Bicarbonato de sódio — Extracto de beladona.

Perturbações gastro-intestinais

FOSFOVITAM — INJECTÁVEL

Complexo fosforado + Vitam. C

COMPOSIÇÃO: — P-dimetilamino-O-toluil-fosfinato sódico — Ácido I-ascórbico puro

Estimulante geral do metabolismo

LABORATÓRIOS DE QUIMIATRIA KEVEL
EDUARDO DE ALMEIDA & C.^a
PORTO

Pestana & Fernandes, Lda.

Drogas, Produtos Químicos e Especialidades Farmacêuticas

Telefones: 36 61 71 (PPC-5 linhas)

Telegramas: PEBRANDES

Centro de Documentação Farmacêutica

Reagentes puros, «pro-analysis», e para microanálises / Indicadores e indicadores de PH / Matérias corantes e soluções de matérias corantes / Preparações diversas para microscopia / Preparados para fins científicos / Papéis reagentes e papéis de filtro

Acessórios de Farmácia e de Laboratório
Fornecimentos completos para Farmácias e Drogarias

Fornecedores dos Hospitais e Laboratórios oficiais

Rua dos Sapateiros, 39 (Armazéns Gerais e Escritório)

Rua da Prata, 153 (Representações)

Rua da Madalena, 179 (Químicos)

LISBOA

Os resultados obtidos constam do Quadro 4 e a sua representação gráfica constitui a Figura 4.

Tempo decorrido	0	1	2	3	4	5	6	7	8
ϕ	79,3	47,2	27,4	17,0	7,1	4,3	2,6	1,5	0,8
ϕ_0/ϕ	1,0	1,7	2,8	4,6	11,1	18,5	30,5	52,8	99,1

Quadro 4

A equação 4) mostra-nos que

$$k' = k \log e = \log(\phi_0/\phi)t \quad 5)$$

valor que representa o coeficiente angular da recta da Fig. 4, e podemos determinar a partir da representação dessa figura, notando, por exemplo, que, para $t = 8$ semanas, se tem

$$\log(\phi_0/\phi) = 2 \quad 6)$$

e portanto

$$k' = 2/8 = 0,25 \quad 7)$$



Fig. 4

Como

$$\log e = \log 2,718 = 0,4343$$

teremos, entrando com este valor em 5), que a constante de velocidade k da reacção será

$$k = k'/\log e = 0,25/0,4343 \quad 8)$$

ou

$$k = 0,58 \text{ semana}^{-1}$$

9)

o que nos permite concluir que o declínio da intensidade de fluorescência das soluções aquosas de *cromotropato dissódico* se processa de acordo com a equação

$$\phi = \phi_0 \exp(-0,58 t)$$

em que ϕ_0 representa a intensidade de fluorescência das soluções de *cromotropato dissódico* no momento da preparação, ϕ a intensidade de fluorescência no momento considerado, e t o tempo em semanas que decorreu entre o momento da preparação e o momento considerado.

8. As soluções de *cromotropato dissódico* não só apresentam um declínio da intensidade de fluorescência que se processa segundo a equação cinética das reacções de 1.^a ordem, como apresentam também, o que se verifica pelo exame do gráfico da Fig. 3, uma variação da intensidade de fluorescência em função do pH do meio, que reveste aspecto pouco comum, pelo menos em relação aos casos que estudámos.

A curva representativa da variação do fenómeno, apresenta dois máximos, um dos quais situado a cerca de $\text{pH} = 3,7$, e outro situado entre os valores de $\text{pH} = 8,5$ e $\text{pH} = 9,5$, sendo este último um máximo absoluto.

A interpretação dos fenómenos de fluorescência cerca-se de numerosas dificuldades, decorrentes da complexidade dos fenómenos que podem encontrar-se na sua origem, como sejam a rigidez das estruturas moleculares, fenómenos de ressonância electrónica, fenómenos decorrentes dos estados iónicos possíveis e outros [66, 67, 68, 69].

No caso do *cromotropato dissódico* parece-nos poder atribuir-se à presença de duas funções químicas diferentes na molécula — os radicais do ácido sulfónico e os oxidrilos fenólicos — não só a razão da fluorescência observada, mas ainda a complexidade de que o fenómeno se reveste.

Apenas como sugestão para uma interpretação, somos levados a pensar que o primeiro dos máximos, situado entre $\text{pH} = 3,0$ e $\text{pH} = 4,5$, possa ser atribuído à fluorescência dos iões $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_3\text{S}_2^{2-}$, e a do máximo compreendido entre $\text{pH} = 8,5$ e $\text{pH} = 9,5$ à dos iões $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2^{2-}$ resultantes da ionização dos hidroxilos da função fenol.

O fosso entre os dois máximos, pela região da escala de valores de pH em que se situa, abrangendo a zona de neutralidade, poderia ser atribuído à dominância de moléculas não ionizadas, e não fluorescentes, de *cromotropato dissódico*.

Esta opinião encontra um certo fundamento nas afirmações de BECKER [70] que, referindo-se à influência dos grupos hidroxilo

sobre a fluorescência dos compostos aromáticos, diz: *The introduction of hydroxyl or methoxyl into the benzene nucleus shifts the fluorescence to longer wavelenghts. It is probable that the quantum yields of emission are increased over that of benzene. In aqueous solutions of the hydroxy compounds, the quantum yields may vary markedly with the pH. For example, phenol fluoresces in neutral and acidic solutions but not at pH > 12. Thus the anion appears to be incapable of fluorescence while the neutral molecule is fluorescent. Moreover, anisole fluoresces quite uniformly throughout the entire pH range. This gives added support to the conclusion that it is the phenolate anion that is nonfluorescent.*

It appears that in the case of naphthols (the 1- and 2-mono derivatives) the neutral molecules and the anions do fluoresce, at least in aqueous solutions to pH 13,3. Moreover, in one case (the 2 derivative) the fluorescence intensity of the anion is greater than that of the unionized form. The dihydroxy compounds show fluorescence, as do their singly charged anionic forms in basic aqueous solution. One of the doubly charged anions (the 1,3 derivative) also shows fluorescence. The reasons for the differences among these compounds are not clear.

Vê-se assim quanto é ainda nebuloso o conhecimento sobre este assunto, e, a nossa opinião, como é evidente, não passa de mera hipótese cuja validade só poderia ser verificada após a efectivação de medidas dos valores de pK das soluções de *cromotropato dissódico* em meios com valores diferentes de pH, seguida de um estudo crítico dos resultados obtidos [71].

9. Como conclusão das experiências a que procedemos, poderemos afirmar que:

a) — as soluções de *cromotropato dissódico*, comportam-se, no que respeita à variação da intensidade de fluorescência com a concentração, nos termos da Lei de Perrin;

b) — as soluções de *cromotropato dissódico*, em meio tamponado de pH = 9,0 apresentam a sua intensidade de fluorescência máxima para a concentração aproximada de 1,041 gramas por litro, ou de $2,6 \times 10^{-3}$ moles por litro;

c) — a ser viável a utilização do *cromotropato dissódico* como indicador fluorescente, deveremos usar II a V gotas da solução aquosa a 5 % p/v, para uma tomada de ensaio de 8 a 10 ml;

d) — as soluções aquosas de *cromotropato dissódico* a 5 % p/v, sofrem um declínio do seu poder fluorescente, de acordo com a equação

$$\phi = \phi_0 \exp(-0,58 t)$$

com t expresso em semanas, pelo que só deverão ser utilizadas quando acabadas de preparar;

e) — as soluções de *chromotropato dissódico* apresentam dois máximos da intensidade de fluorescência, localizando-se o primeiro nas vizinhanças de $\text{pH} = 3,7$ e o segundo entre $\text{pH} = 8,5$ e $\text{pH} = 9,5$, com intensidade igual nesta zona;

f) — é nossa opinião, baseada na análise do comportamento geral do fenómeno, que as soluções de *chromotropato dissódico* não são de utilizar como indicadores fluorescentes;

g) — é finalmente nossa opinião que a complexidade das moléculas orgânicas e o desconhecimento que ainda existe da causa íntima dos fenómenos de fluorescência, aconselham a que, na hipótese de se pretender aplicar esta substância como indicador, se realizem estudos prévios com a finalidade de verificar se, entre o *chromotropato dissódico* e as substâncias existentes no meio, ou formadas no decurso da reacção, se produzem interacções prejudiciais ao comportamento do fenómeno.



SUMMARY

1. The interest of the author was directed on the chemical behaviour of several fluorogens, considered as possible fluorescent indicators, with the aim of discovering:

a) — the behaviour of the fluorigen solutions relative to Perrin's Law (variation of the fluorescence intensity as a function of the concentration);

b) — the concentration of each fluorigen which produces the maximum fluorescence intensity;

c) — the degree of stability of the fluorigen solutions over a chosen period;

d) — the variation in the fluorescence intensity of the solutions expressed as a function of the pH of the medium.

The interest of the author was aroused by the disparities mentioned in the literature, and especially by the doubt raised in KONSANTINOVA-SHLEZINGER and in RADLEY and GRANT on the degree of reliance which may be placed on the information given by the several authors.

2. The author's reasearch work was on *chromotropic acid disodium salt dihydrate*, and following these experiments his opinion is that:

a) — the solutions of this fluorigen behaves in accordance with Perrin's Law;

b) — the solutions of this fluorigen present their maximum fluorescence intensity in the concentration of 1,041 grammes per litre, or $2,6 \times 10^{-3}$ moles per litre;

c) — the aqueous solutions of the fluorigen in the concentration of 5 % w/v have no stability, and their fluorescence intensity decays in accordance with the equation

$$\phi = \phi_0 \exp(-0,58 t)$$

t being measured in weeks; the constant of velocity reaction was determined after the experimental data included in the text;

d) — the fluorescence intensity of the fluorigen solutions presents a maximum of fluorescence within the limits of pH = 3,5 and pH = 4,0, and an absolute maximum of fluorescence within the limits of pH = 8,5 and pH = 9,5 with the changes represented in Fig. 3;

e) — the solutions of this fluorigen cannot be recommended as a fluorescent indicator;

f) — the first maximum value reached in the fluorescence intensity can be determined by the ionisation of the acid chemical functions, and the second, by the ionisation of the phenolic chemical functions.

The author draws attention to the opinion of BECKER as to the great difficulty in interpreting similar phenomena.

RÉSUMÉ

1. L'auteur s'est confié la tâche d'étudier le comportement de divers fluorigènes, que l'on peut considérer comme des éventuels indicateurs fluorescents, afin de connaître pour chacune des substances envisagées:

a) — le comportement de l'intensité de fluorescence de ses solutions vis-à-vis de la Loi de Perrin;

b) — la concentration pour laquelle les solutions du fluorigène, en milieu tamponné de pH adéquat, radient une fluorescence d'intensité maximum;

c) — la stabilité des solutions du fluorigène tout au long du temps;

d) — la variation de l'intensité de fluorescence des solutions du fluorigène, lorsque le pH du milieu passe de la valeur pH = 2,0 à la valeur pH = 13,0;

L'étude expérimentale, que l'auteur a réalisée sur diverses substances, a été menée selon le protocole présenté dans ses publications antérieures se rapportant au même sujet, et a eu pour motif la vérification de ce que les valeurs fournies par les textes, qui concernent ce sujet, ne sont pas d'accord.

Au surplus, et spécifiquement, chez KONSTANTINOVA-SHLE-ZINGER et chez RADLEY and GRANT, l'auteur a éprouvé le doute sur la confiance que l'on doit accorder aux valeurs fournies par la bibliographie spécialisée.

2. L'objet des investigations de l'auteur a été cette fois-ci le *sel disodique de l'acide chromotropique dihydraté*, et les résultats obtenus ont permis de formuler les conclusions suivantes:

a) — les solutions du sel disodique de l'acide chromotropique, en milieu tamponné de $\text{pH} = 9,0$, suivent dans leur comportement les prescriptions de la Loi de Perrin;

b) — les solutions du sel disodique de l'acide chromotropique, en milieu tamponné de $\text{pH} = 9,0$, présentent leur fluorescence maximum à la concentration de 1,041 grammes par litre soit $2,6 \times 10^{-3}$ moles par litre;

c) — les solutions du sel disodique de l'acide chromotropique, en eau distillée, à 5 % p/v, ne sont pas stables et leur pouvoir fluorescent décroît rapidement selon la loi traduite par

$$\phi = \phi_0 \exp(-0,56 t)$$

t étant exprimé en semaines, et la valeur du coefficient de vitesse de l'équation ayant été obtenue d'après les valeurs expérimentales insérées dans le présent travail;

d) — la variation de l'intensité de fluorescence des solutions du *sel disodique de l'acide chromotropique*, en fonction du pH du milieu, présente deux maximums; le premier pour la valeur de $\text{pH} = 3,7$ et le second pour des valeurs comprises entre $\text{pH} = 8,5$ et $\text{pH} = 9,5$, avec des sauts de l'intensité de fluorescence représentés à la Fig. 3;

e) — l'auteur est d'avis que les solutions du sel disodique de l'acide chromotropique ne sont pas à conseiller comme indicateurs fluorescents, en vertu, soit de leur faible stabilité, soit du comportement spécifique de l'intensité de fluorescence de ces solutions lorsque varie le pH du milieu;

f) — l'auteur est d'avis que l'existence des deux maximums de fluorescence doit être attribuée à la présence en solution des ions de l'acide sulfonique pour les valeurs faibles du pH du milieu, et à l'ionisation des fonctions phénoliques pour les valeurs plus élevées.

L'auteur partage l'opinion de BECKER, qui considère actuellement très difficile l'interprétation de la fluorescence des composés portant dans leur structure chimique deux fonctions phénoliques.

APÊNDICE

CROMOTROPATO DISSÓDICO

Solvente: água destilada

Concentração: 5 % p/v

Gotas de solução adicionadas a cada tubo: III

Volume de tampão em cada tubo de fotofluorímetro: 8 ml

Acertou-se o ponto 90,0 da escala do fotofluorímetro com o pH 9,0

1.ª determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1ª série	10,5	15,5	24,2	39,2	37,0	15,8	7,0	4,5	4,8	5,0	5,0	5,0
2ª série	11,0	16,0	24,2	39,0	37,8	16,2	7,3	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
3ª série	11,0	16,0	24,3	39,0	37,5	16,0	7,6	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4ª série	11,0	16,0	24,5	39,2	37,5	16,0	7,1	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
5ª série	11,0	16,0	24,6	39,8	38,0	16,0	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
médias	10,9	15,9	24,3	39,2	37,5	16,0	7,2	4,9	4,9	5,0	5,0	5,0

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1ª	69,7	90,0	90,0	90,0	75,4	75,5	4,5	5,0	5,5	6,0	4,6
2ª	70,5	90,0	90,0	90,0	75,0	74,5	4,5	4,9	5,2	6,0	4,6
3ª	70,3	90,0	90,0	90,0	75,2	75,0	4,5	4,8	5,0	6,0	4,6
4ª	70,5	90,0	90,0	90,0	74,5	74,8	4,5	4,8	5,0	6,0	4,6
5ª	70,2	90,0	90,0	90,0	75,0	74,9	4,2	4,5	5,0	6,0	4,6
m.	70,2	90,0	90,0	90,0	75,0	74,9	4,4	4,8	5,1	6,0	4,6

Quadro 5

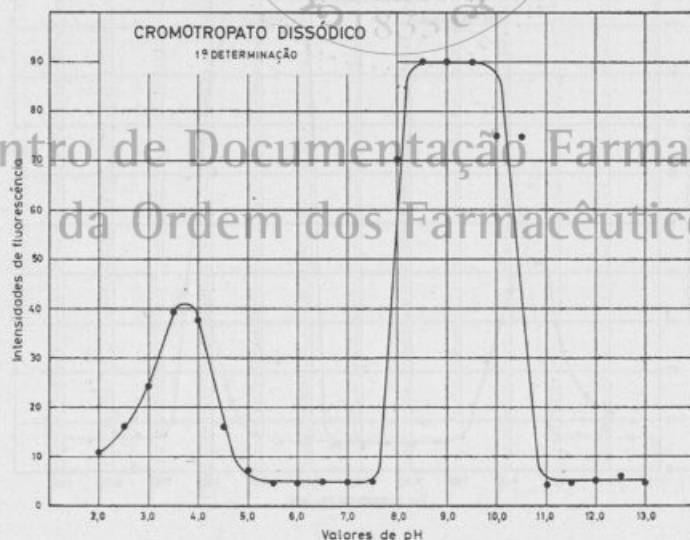


Fig. 5

Varição do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (1.ª determinação)

2.^a determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1. ^ª série	11,3	14,9	25,0	41,8	36,5	12,2	7,0	6,0	6,0	5,8	5,2	5,8
2. ^ª série	11,5	15,1	26,0	41,7	36,2	12,7	7,0	6,2	6,0	6,0	5,3	5,7
3. ^ª série	12,0	15,2	26,0	41,8	36,4	12,3	7,0	6,0	6,0	5,9	5,2	5,7
4. ^ª série	12,0	15,5	26,0	42,2	37,0	12,7	7,0	6,0	6,0	5,9	5,4	5,8
5. ^ª série	11,5	15,0	25,8	41,7	36,0	12,2	7,0	6,0	5,8	5,6	5,0	5,5
médias	11,6	15,1	25,7	41,8	36,4	12,4	7,0	6,0	5,9	5,8	5,2	5,7

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1. ^ª	73,8	90,0	91,0	89,2	69,3	60,0	7,3	7,3	8,3	6,0	4,8
2. ^ª	73,0	90,0	91,0	88,7	68,8	59,0	7,4	7,4	8,2	6,0	5,0
3. ^ª	73,3	90,0	91,0	88,4	68,0	60,0	7,8	7,8	8,5	6,3	5,0
4. ^ª	74,0	90,0	91,0	88,8	68,0	59,0	7,7	7,7	8,5	6,2	5,1
5. ^ª	74,0	90,0	91,6	88,6	68,0	59,0	7,1	7,1	8,0	6,1	4,7
m.	73,6	90,0	91,1	88,7	68,4	59,4	7,4	7,4	8,3	6,1	4,9

Quadro 6

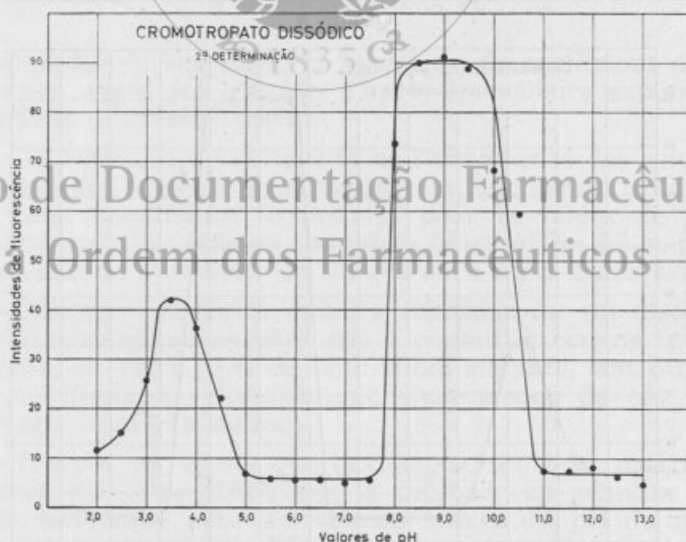


Fig. 6

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (2.^a determinação)

3.ª determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1.ª série	9,2	12,2	20,4	34,8	33,1	14,0	7,5	5,8	6,0	5,2	6,0	8,0
2.ª série	9,9	12,9	21,0	36,0	34,0	14,0	7,2	5,7	5,5	5,1	6,0	7,0
3.ª série	9,3	12,4	20,3	35,8	33,7	13,3	7,0	5,5	5,2	5,0	5,9	7,7
4.ª série	9,8	12,8	20,7	36,0	34,0	13,8	7,2	5,3	5,3	5,1	6,0	8,0
5.ª série	9,3	12,8	20,8	36,2	33,4	14,0	7,2	5,7	5,5	5,1	6,1	7,4
médias	9,5	12,6	20,6	35,7	33,6	13,8	7,2	5,6	5,5	5,1	6,0	7,6

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1.ª	64,0	90,0	88,0	84,9	64,8	58,7	7,8	7,5	8,0	6,9	5,8
2.ª	63,9	90,0	89,0	87,1	62,7	57,7	7,5	7,4	7,8	6,3	5,2
3.ª	63,0	90,0	89,0	85,3	63,0	56,8	7,3	7,1	7,6	6,3	5,1
4.ª	64,1	90,0	88,1	86,2	63,0	57,0	7,2	7,3	7,8	6,4	5,2
5.ª	64,2	90,0	88,2	86,1	63,5	57,0	7,2	7,2	7,8	6,3	5,2
m.	63,8	90,0	88,5	85,1	63,4	57,4	7,4	7,3	7,8	6,4	5,3

Quadro 7

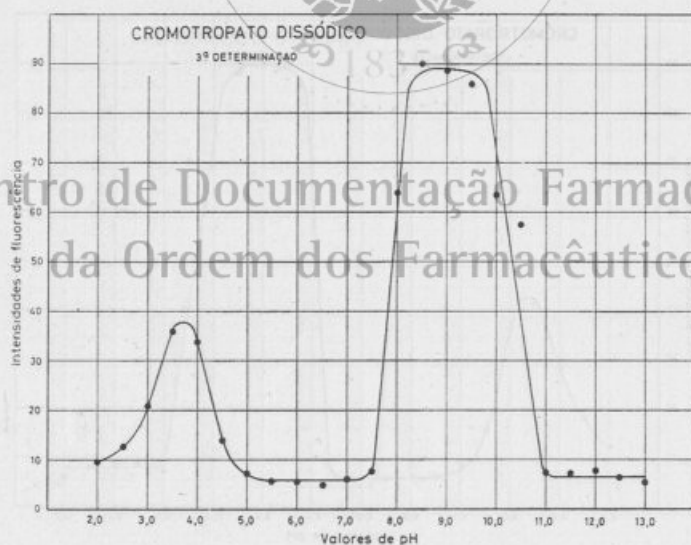


Fig. 7

- Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (3.ª determinação)

4.ª determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1ª série	12,7	18,2	28,8	42,1	36,0	15,2	8,8	7,0	7,2	7,0	6,5	6,5
2ª série	12,1	17,5	28,0	41,2	36,0	15,6	8,5	5,5	5,5	5,0	6,5	5,5
3ª série	12,0	17,3	27,5	41,5	35,0	15,1	8,5	6,2	6,0	6,0	5,8	6,0
4ª série	12,2	17,5	27,8	41,0	36,5	15,5	8,6	6,5	6,5	6,0	6,2	6,1
5ª série	12,5	18,0	28,2	42,0	37,0	15,3	8,6	6,5	6,5	6,0	6,0	6,0
médias	12,3	17,7	28,0	41,5	36,1	15,3	8,6	6,3	6,3	6,0	6,0	6,0

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1ª	70,6	90,0	90,2	87,2	69,0	68,8	7,5	8,2	8,0	7,6	6,0
2ª	69,5	90,0	89,6	88,2	69,2	69,5	7,5	9,0	8,8	8,2	6,0
3ª	69,5	90,0	89,6	88,0	69,2	68,8	7,4	8,7	8,5	8,0	6,0
4ª	70,0	90,0	89,8	87,8	68,8	70,0	7,5	8,8	8,8	8,2	6,0
5ª	71,5	90,0	89,0	88,0	68,3	71,5	7,8	9,0	8,9	8,0	6,0
m.	70,2	90,0	89,6	87,8	68,9	69,7	7,5	8,7	8,6	8,0	6,0

Quadro 8

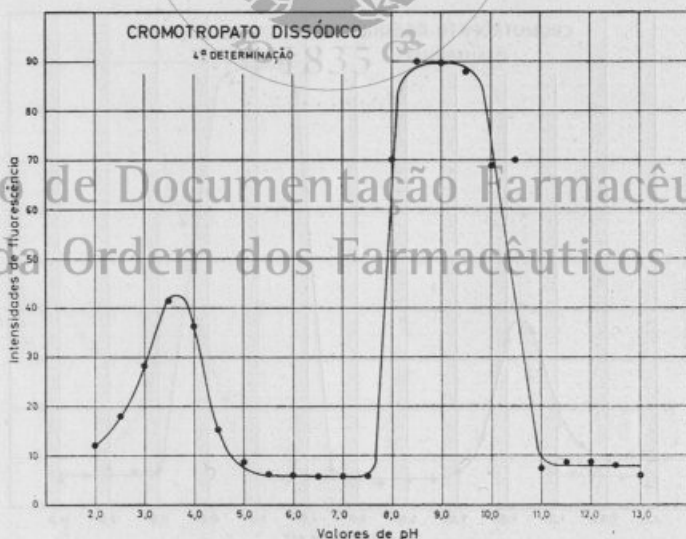


Fig. 8

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (4.ª determinação)

5.^a determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1. ^a série	10,0	14,0	23,0	39,1	38,4	16,3	7,0	5,3	5,0	5,0	5,3	5,4
2. ^a série	9,5	13,8	22,4	37,4	37,5	16,2	7,1	5,5	5,4	5,2	5,5	5,7
3. ^a série	10,0	14,0	22,8	37,9	37,0	17,3	7,7	5,9	5,7	5,2	5,7	5,8
4. ^a série	10,0	13,9	22,7	38,1	37,4	16,6	7,3	5,7	5,2	5,4	5,5	5,4
5. ^a série	9,8	13,8	22,2	38,0	37,3	16,8	7,2	5,8	5,3	5,2	5,3	5,5
médias	9,8	13,9	22,6	38,1	37,5	16,6	7,2	5,6	5,3	5,2	5,4	5,5

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1. ^a	68,0	90,0	89,8	87,0	73,9	64,6	7,0	7,2	7,0	5,5	5,0
2. ^a	68,3	90,0	90,2	88,2	75,0	65,0	7,3	6,8	6,5	5,2	4,8
3. ^a	68,8	90,0	90,2	88,0	74,0	65,6	7,0	6,8	6,8	5,2	4,9
4. ^a	68,0	90,0	89,2	86,8	73,2	65,2	6,8	6,8	6,5	5,2	4,9
5. ^a	68,0	90,0	89,8	87,5	73,5	65,2	6,8	6,7	6,7	5,2	4,9
m.	68,2	90,0	89,8	87,5	73,9	65,1	7,0	6,9	6,7	5,2	4,9

Quadro 9

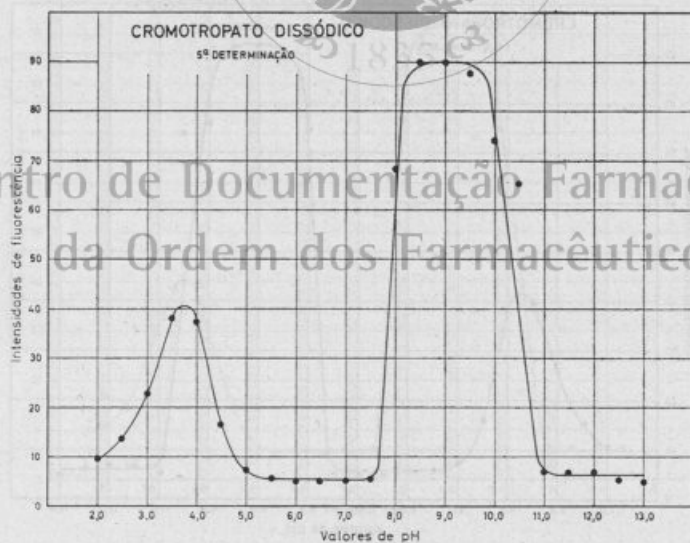


Fig. 9

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (5.^a determinação)

6.^a determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1. ^a série	11,1	16,2	26,0	39,8	38,8	16,0	7,7	6,1	5,8	5,8	5,0	5,1
2. ^a série	10,2	15,0	26,0	40,0	37,8	16,2	7,8	6,0	5,8	4,9	5,4	5,3
3. ^a série	11,0	15,7	25,8	39,5	37,3	16,2	7,7	6,2	5,9	5,0	5,3	5,6
4. ^a série	10,8	15,2	25,8	39,2	37,4	16,0	7,2	5,8	5,4	4,8	5,1	5,1
5. ^a série	10,7	15,1	26,1	39,0	37,3	15,9	7,0	5,9	5,3	4,8	5,2	5,2
médias	10,7	15,4	25,9	39,5	37,7	16,0	7,5	6,0	5,6	5,0	5,2	5,2

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1. ^a	69,8	90,0	89,8	91,2	75,0	74,0	5,3	6,8	6,8	6,2	4,8
2. ^a	70,0	90,0	90,0	91,3	75,9	74,1	5,8	7,0	7,3	7,0	5,3
3. ^a	69,3	90,0	90,1	91,8	76,2	74,1	5,8	7,0	7,0	6,4	5,8
4. ^a	70,0	90,0	90,8	91,8	76,4	74,0	5,4	6,9	7,0	6,3	4,8
5. ^a	69,5	90,0	90,3	91,4	75,8	73,9	5,3	6,8	6,9	6,2	4,8
m.	69,7	90,0	90,2	91,5	75,8	74,0	5,4	6,9	7,0	6,4	4,9

Quadro 10

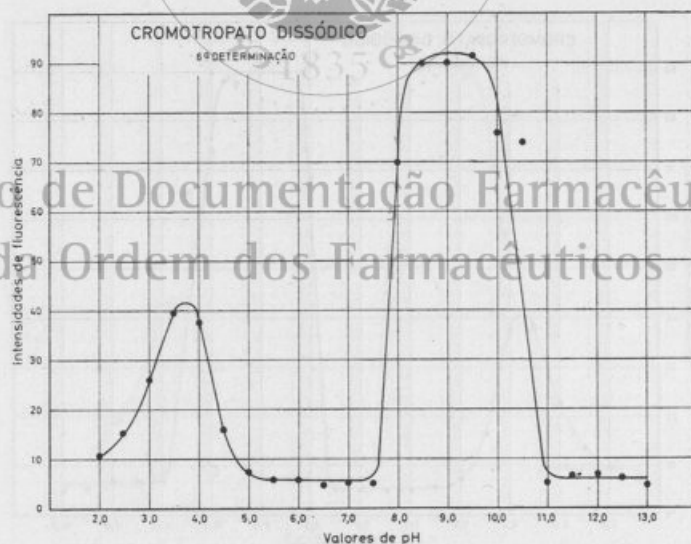


Fig. 10

Varição do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (6.^a determinação)

7.ª determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1ª série	11,4	16,3	25,0	39,9	36,0	18,6	8,4	5,7	5,5	5,5	5,8	6,2
2ª série	10,5	15,1	25,0	38,9	36,2	18,9	8,2	5,9	5,3	5,7	5,4	5,9
3ª série	11,3	15,3	24,8	38,4	36,2	19,7	8,1	6,3	5,9	5,9	5,7	5,8
4ª série	11,1	15,3	24,8	38,5	36,0	18,7	7,9	6,1	5,8	5,7	5,5	5,8
5ª série	11,0	15,8	25,1	38,4	35,9	18,7	7,4	6,2	5,7	5,5	5,4	6,4
médias	11,0	15,5	24,9	38,8	36,0	18,9	8,2	6,0	5,6	5,6	5,5	6,0

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1ª	68,4	90,0	92,2	90,7	71,7	55,3	5,9	6,8	7,1	6,4	4,9
2ª	68,7	90,0	93,4	90,8	71,6	55,9	6,7	6,5	6,9	6,7	5,1
3ª	69,2	90,0	93,2	91,3	71,1	55,6	6,1	7,0	6,6	6,8	5,1
4ª	68,4	90,0	92,0	91,3	72,0	55,9	6,0	6,7	6,8	6,4	5,3
5ª	68,4	90,0	92,7	89,9	70,1	55,4	5,9	6,5	6,6	6,5	5,1
m.	68,6	90,0	92,7	91,0	71,1	64,6	6,1	6,7	6,8	6,5	5,1

Quadro 11

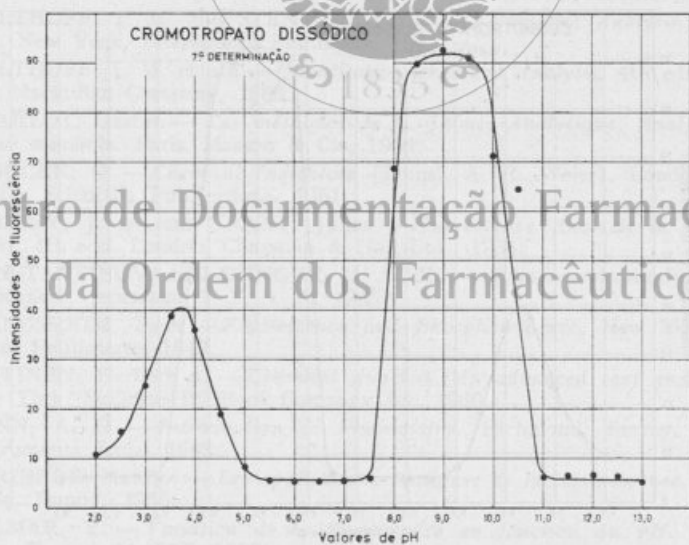


Fig. 11

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (7.ª determinação)

8.ª determinação

pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
1ª série	10,4	14,0	23,6	38,6	35,3	18,2	7,2	5,7	4,9	5,1	4,9	6,3
2ª série	9,9	14,2	23,0	37,7	36,7	18,4	7,3	5,4	5,1	4,9	5,2	6,3
3ª série	10,4	14,2	23,4	37,2	33,7	18,4	7,9	5,0	5,1	5,0	5,0	6,4
4ª série	10,4	14,1	23,3	37,6	34,7	18,2	7,5	5,2	5,3	5,0	5,0	5,9
5ª série	10,2	14,0	22,8	37,5	36,4	18,1	7,4	5,3	5,1	5,0	5,1	5,8
médias	10,2	14,1	23,2	37,7	35,3	18,2	7,4	5,3	5,1	5,0	5,0	6,1

pH	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0	12,5	13,0
1ª	66,9	90,0	92,3	88,7	69,5	65,1	5,8	6,2	5,8	5,5	4,4
2ª	67,9	90,0	93,5	89,3	69,3	65,9	5,5	5,8	6,0	5,7	4,7
3ª	68,7	90,0	93,0	81,1	70,0	66,7	5,5	5,8	6,4	6,1	4,8
4ª	69,2	90,0	92,5	88,9	69,8	67,2	5,5	5,8	6,1	5,9	4,4
5ª	69,7	90,0	92,9	88,7	70,0	65,7	5,5	5,7	6,2	6,0	4,5
m.	67,9	90,0	92,8	88,7	69,7	66,1	5,5	5,9	6,1	5,8	4,5

Quadro 12

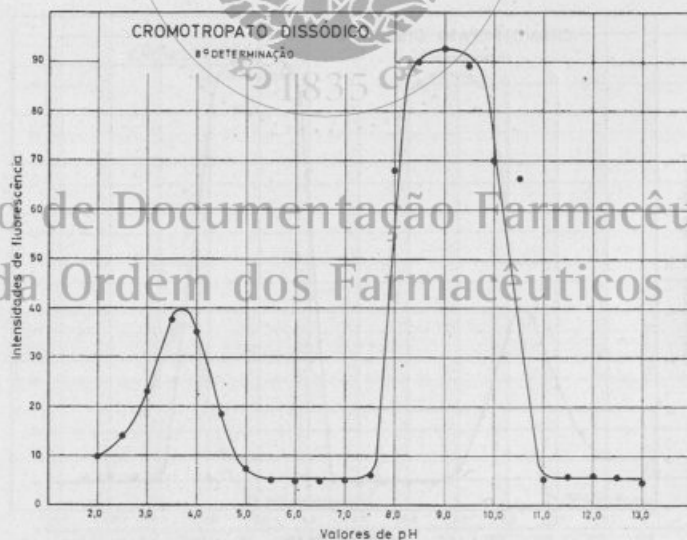


Fig. 12

Variação do poder fluorescente das soluções de *cromotropato dissódico* com o pH do meio (8.ª determinação)

BIBLIOGRAFIA

- [1] VOLMAR, Y. y CLAVERA, J. M. — *Mésure de l'acidité des vins rouges au moyen des indicateurs fluorescents*. J. Pharm. Chim., **13**, 561 (1931).
- [2] VOLMAR, Y. et WIDDER, E. — *Acidimétrie en présence de quelques indicateurs fluorescents, notamment l'ombelliférone*. Chim. Ind., **21**, 160 C (1928).
- [3] ERDEY, L. und BUZÁS, I. — *Redoxitrationen mit Luminescenzindikatoren. II. Bestimmungen mit Natriumhypobromit-Masslösung*. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **6**, 93 (1955).
- [4] ERDEY, L. und BUZÁS, I. — *Redoxitrationen mit Luminescenzindikatoren. III. Bestimmungen mit Natriumhypochlorit-Masslösung*. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **6**, 115 (1955).
- [5] ERDEY, L. und BUZÁS, I. — *Redoxitrationen mit Luminescenzindikatoren. IV. Bestimmungen mit Natriumarsenit-Masslösung*. Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **6**, 123 (1955).
- [6] ERDEY, L., BUZÁS, I. and VIGH, K. — *Luminol as a fluorescent acid-base indicator*. Talanta, **13**, 463 (1966).
- [7] VOLMAR, Y. — *Les phénomènes de fluorescence en analyse chimique: volumétrie par fluorescence*. Arch. Phys. Biol., **6**, 61 (1927-28).
- [8] VOLMAR, Y. — *Les sels d'uranyle comme indicateurs fluorescents: leur emploi en analyse chimique*. Bull. Soc. chim. France, **41**, 1155 (1927).
- [9] VOLMAR, Y. — *Analyse par fluorescence: Alcalimétrie et acidimétrie avec l'ombelliférone et la quinine comme indicateurs*. Bull. Soc. chim. France, **41**, 774 (1927).
- [10] BOUTARIC, A. — *La fluorescence des solutions*. Rev. Gén. Sci., **51**, 176 (1941).
- [11] KOLTHOFF, I. M. and STENGER, V. A. — *Volumetric Analysis*, 2nd Rev. edn. New York, Interscience Publishers, 1942.
- [12] KOLTHOFF, I. M. et alii — *Quantitative Chemical Analysis*, 4th edn. London, The Macmillan Company, 1969.
- [13] CHARLOT, Gaston — *Les méthodes de la Chimie Analytique, Analyse quantitative minérale*. Paris, Masson & Cie, 1966.
- [14] TOMICEK, O. — *Chemical Indicators* (Transl. A. R. Weier). London, Butterworths Scientific Publications, 1951.
- [15] RADLEY, J. A. and GRANT, Julius — *Fluorescence Analysis in Ultra-violet Light*, 4th edn. London, Chapman & Hall Ltd., 1954.
- [16] KONSTANTINOVA-SHLEZINGER, M. A., Ed. — *Fluorimetric Analysis* (Transl. N. Kaner). Jerusalem, I. P. S. T., 1965.
- [17] PRINGSHEIM, Peter — *Fluorescence and Phosphorescence*. New York, Interscience Publishers, 1949.
- [18] LAITINEN, Herbert A. — *Chemical Analysis. An advanced text and reference*. New York, McGraw-Hill Book Company Inc. 1960.
- [19] GUNN, A. H. — *Introduction to Fluorimetry*. Richmond, Surrey, Electronic Instruments Ltd., 1963.
- [20] DÉRIBERÉ, Maurice — *Les applications pratiques de la luminescence*, 3ème ed.. Paris, Dunod, 1955.
- [21] VOLMAR, Y. — *Variation de la fluorescence en fonction du pH*. Bull. Soc. chim. France, **41**, 302 (1927).
- [22] LANGE, Norbert Adolph — *Handbook of Chemistry*, 10th edn rev. New York, McGraw-Hill Book Co, 1967.
- [23] TOMICEK, O. — *Chemical Indicators* (Transl. A. R. Weier). London, Butterworth Scientific Publications, 1951, Cap. VIII, p. 203.

- [24] RADLEY, J. A. and GRANT, Julius — *Fluorescence Analysis in Ultra-violet Light*. London, Chapman & Hall Ltd., 1954, p. 420.
- [25] EASTMAN KODAK COMPANY — *Fluorescent Indicators*. Org. chem. Bull., 29 (4), 1957.
- [26] DERIBÈRE, Maurice — *Tableau des principaux indicateurs fluorescents et leur zone de virage*. Ind. Chim., 24, 163 (1937).
- [27] DERIBÈRE, Maurice — *Les indicateurs fluorescents. Leur emploi. L'importance du rH em fluorescence*. Tiba, 1937, 349 (1937).
- [28] DE MENT, Jack — *Fluorescent Indicators* in «Handbook of Chemistry and Physics», 49th edn, Robert C. Weast Ed., Cleveland, Ohio, The Chemical Rubber Co, 1968, p. D 83.
- [29] UDENFRIEND, Sidney — *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, 3th Print., New York, Academic Press, 1964, p. 472.
- [30] KONSTANTINOVA-SHLEZINGER, M. A., Ed. — *Fluorimetric Analysis*, (Transl. N. Kaner). Jerusalém, I. P. S.-T., 1965, p. 109.
- [31] RADLEY, J. A. and GRANT, Julius — *Fluorescence Analysis in Ultra-violet Light*, 4th edn. London, Chapman & Hall Ltd., 1954, p. 421.
- [32] PASSWATER, Richard — *Guide to Fluorescence Literature*, Vol. 1. New York, Plenum Press Data Division, 1967.
- [33] PASSWATER, Richard — *Guide to Fluorescence Literature*, Vol. 2. New York, Plenum Data Corporation, 1970.
- [34] PERRIN, Francis — *Loi de décroissance du pouvoir fluorescent en fonction de la concentration*. C. R. Acad. Sci. (Paris), 178, 1978 (1924).
- [35] PERRIN, Francis — *La Fluorescence des Solutions*. Ann. Phys. (Paris), 12, 169 (1929).
- [36] PENG, C. T. — *The validity of Perrin's Equation in Solute Quenching*. Molec. Cryst., 4, 109 (1968).
- [37] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Estudos sobre fluorescência. Variação do poder fluorescente das soluções de diversas substâncias com a concentração e o pH do meio*. Lisboa, Instituto Nacional de Investigação Industrial, 1971.
- [38] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Estudos sobre fluorescência. I. Variação da intensidade de fluorescência das soluções de metil-umbeliferona com a concentração e o pH do meio*. Rev. Port. Farm., 21, 54 (1971).
- [39] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Études sur la fluorescence. II. Variation de l'intensité de fluorescence des solutions de luminol avec la concentration et le pH du milieu*. Rev. Port. Farm., 21, 219 (1971).
- [40] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Estudos sobre fluorescência. III. Variação da intensidade de fluorescência das soluções de metil-esculetina com a concentração e o pH do meio*. Rev. Port. Farm., 21, 245 (1971).
- [41] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Studies on fluorescence. IV. Variation of the fluorescence intensity of 1-naphthol, as a function of the concentration and as a function of the pH of the medium*. Rev. Port. Farm., 21, 338 (1971).
- [42] GOMES, DÁMASO José da Silva — *Estudos sobre fluorescência. V. Variação da intensidade de fluorescência das soluções de floxina com a concentração e o pH do meio*. Rev. Port. Farm., 21, 363 (1971).
- [43] STECHER, Paul G., Ed. — *The Merck Index of Chemicals and Drugs*, 8th edn. Rahway, New Jersey, U. S. A., Merck & Co, 1968.
- [44] ROSE, Arthur and Elizabeth — *The Condensed Chemical Dictionary*, 7th edn, 4th Print. New York, Reinhold Publ. Corp., 1969.
- [45] RADLEY, J. A. and GRANT, Julius — *Fluorescence Analysis in Ultra-violet Light*, 4th ed. London, Chapman & Hall Ltd., 1954, p. 421.
- [46] CHASE, Merrill W. — *Buffers*. Meth. Immun. Immunochem., Vol. 2, William Chase, Ed., New York, Academic Press, 1968, p. 365.
- [47] MERCK, E. — *Buffer Substances. Buffer Solutions. Buffer Titralsols*. Darmstadt, E. Merck, s/d.

- [48] BATES, Roger G. — *Determination of pH. Theory and Practice*. New York, John Wiley & Sons Inc, 1965.
- [49] DIEM, Konrad — *Documenta Geigy. Tables Scientifiques*, 6ème ed. Bâle, J. R. Geigy S. A., 1963.
- [50] CANALS, M. E. et alii — *Sur la fluorescence des sels de quinine*. Bull. Soc. chim. France, **2**, 21 (1935).
- [51] CHEN, Raymond F. — *Some characteristics of the fluorescence of quinine*. Anal. Biochem., **19**, 374 (1967).
- [52] DROBNIK, Jaroslav and YEARGERS, Edward — *On the use of Quinine Sulfate as a fluorescent standard*. J. molec. Spectrosc., **19**, 454 (1966).
- [53] LINNEWIEL, H. A. and VISSER, B. J. — *Fluorescence of Quinine in an Alkaline Medium and in Absolute Ethanol*. Nature. **195**, 699 (1962).
- [54] RUSAKOWICZ, R. and TESTA, A. C. — *A comparison of quinine bisulfate and 9,10 — diphenylanthracene as fluorescent standards*. J. phys. Chem., **72**, 793 (1968).
- [55] NICHOLAS, J. W. and POLLAK, F. F. — *The isolation of the lines of the mercury arc by filters*. Analyst, **75**, 662 (1950).
- [56] CORNING GLASS WORKS — *Glass Color Filters*. New York, Corning, 1965.
- [57] RADLEY, J. A. and GRANT, Julius — *Fluorescence Analysis in Ultra-violet Light*, 4th edn. London, Chapman & Hall Ltd, 1954, p. 420.
- [58] TOMICEK, O. — *Chemical Indicators* (Transl. A. R. Weier). London, Butterworths Scientific Publications, 1951, p. 209.
- [59] DE MENT, Jack — *Fluorescent Indicators*, in «Handbook of Chemistry and Physics», 49th edn, Robert C. Weast Ed., Cleveland, Ohio, The Chemical Rubber Co, 1968, p. D83.
- [60] KONSTANTINOVA-SHLEZINGER, M. A. Ed. — *Fluorimetric Analysis* (Transl. N. Kaner), Jerusalem, I. P. S. T., 1965, p. 109.
- [61] DÉRIBÈRE, Maurice — *Les applications pratiques de la luminescence*, 3ème ed. Paris, Dunod, 1955, p. 119.
- [62] VIGNERON, H. — *Précis de Chimie Physique*, 2ème ed. Paris, Masson & Cie, 1926.
- [63] PERRIN, Jean et CHOUCROUN, Mlle — *Vitesse des réactions photochimiques*. C. R. Acad. Sci. (Paris), **187**, 697 (1928).
- [64] PERRIN, Francis — *Détermination de la vie moyenne dans l'état activé des molécules fluorescentes*. C. R. Acad. Sci. (Paris), **182**, 219 (1926).
- [65] PERRIN, Jean et CHOUCROUN, Mlle — *Fluorescence et lois générales relatives aux vitesses de réaction*. C. R. Acad. Sci. (Paris), **178**, 1401 (1924).
- [66] KAN, Robert O. — *Organic Photochemistry*. New York, McGraw-Hill Book Co, 1966.
- [67] WAYNE, R. P. — *Photochemistry*, London, The Butterworth Group, 1970.
- [68] CALVERT, Jack G. and PITTS, Jr, James N. — *Photochemistry*. New York, John Wiley & Sons Inc, 1967.
- [69] CHAPMAN, O. L. — *Photochemical Rearrangements of Organic Molecules*. Adv. Photochem., Interscience Publishers, New York, **1**, 323 (1963).
- [70] BECKER, Ralph S. — *Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence*. New York, Wiley Interscience, 1969, p. 147.
- [71] SYKES, Peter — *A guidebook to mechanisms in organic chemistry*, 3th edn. London, Longmans Group Ltd, 1970.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios do Instituto Nacional de Investigação Industrial, e constituiu encargo exclusivo desta Instituição.

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL EM ANÁLISES CLÍNICAS

C. PALLA GARCIA

Tenente farmacêutico

Assistente eventual da Faculdade de Farmácia de Lisboa

I — INTRODUÇÃO

As múltiplas implicações de ordem clínica e de técnica executiva justificam o interesse, ainda largamente manifestado por experimentadores e investigadores, no doseamento do colesterol.

Movidos pelas mesmas razões, experimentámos métodos de determinação do colesterol, amplamente difundidos, com o intuito principal de seleccionar o que se nos afigurasse mais válido para aplicação ao trabalho diário dum laboratório de análises clínicas.

1.1 — O COLESTEROL E OS SOROS SANGUÍNEOS



Fig. 1

O colesterol, 3-cis-hidroxi-5-colesteno ou colest-5-eno-3 β -ol, que pode supor-se derivado do núcleo fundamental ciclopentanoperhidrofenantreno, apresenta dois principais centros de reacção:

- na posição 3 onde se liga o oxidrilo que é muito reactivo devido a sua situação equatorial.
- na ligação dos carbonos 5-6 onde se encontra a dupla ligação [3, 6].

O colesterol e os lípidos estão envolvidos em situações metabólicas, interligadas com os mecanismos da arterioesclerose, julgando-se que a sua deposição nas paredes dos vasos, pelas alterações que neles provocam, desempenhe um papel altamente prejudicial para a hemodinâmica. Assim, numa primeira etapa, o colesterol deposita-se nas túnicas média e interna, seguindo-se uma reacção de formação de tecido organizado que vai perturbar a função da parede vascular, aparecendo, numa fase mais avançada, as placas de ateroma. Ulteriormente, surge estenose e obliteração dos vasos arteriais com o

consequente prejuízo ou suspensão da circulação no território vascular atingido [11].

Normalmente, o colesterol encontra-se no sangue distribuído nos componentes celulares e no plasma; contudo, as suas determinações para estudos clínicos são, vulgarmente, realizadas no plasma e soro pois aí, a concentração revela-se variável consoante as diversas modificações fisiológicas [1, 3, 6, 13].

Nos soros sanguíneos normais, o colesterol está parcialmente esterificado, tendo-se observado que a ligação era efectuada pelo oxidrilo com diversos ácidos gordos como o plamítico, o oleico e o linoleico [6, 14]. O grau dessa esterificação pode fornecer indicações clínicas das funções hepáticas, visto que a redução da função esterificante da célula hepática lesada ou insuficiente conduz a uma diminuição da esterificação do colesterol [12].

1.2 — O COLESTEROL E AS REACÇÕES DE COLORAÇÃO

A apreciação do colesterol pode envolver diversos processos gravimétricos, volumétricos, nefelométricos [6] etc.; todavia, as determinações espectrofotométricas, pela sua simplicidade e exactidão, são as mais difundidas.

As reacções da coloração, usadas nos doseamentos espectrofotométricos, baseiam-se, quase todas, na acção desidratante e oxidante dos ácidos fortes, usualmente, o sulfúrico.

Esquematizaremos as mais vulgarmente referidas:

Autor	Data	Reagentes	Coloração
SALKOWSKI [1, 2, 3, 6,]	1872	Clorofórmio + ácido sulfúrico	Vermelho
LIEBERMAN [1, 2, 3, 6]	1885	Anidrido acético + ácido sulfúrico	Verde
BOUCHARD [1, 2, 3, 6]	1890	Clorofórmio + anidrido acético + ácido sulfúrico	Verde
TSCHUGAERF [6]	1900	Cloreto de acetilo + cloreto de zinco + ácido acético	Roxo
TRENDER [4]	1952	Cloreto de acetilo + dicloroetano + ácido sulfúrico	Vermelho
PEARSON [3, 4, 6, 24]	1953	Ac. p. toluenosulfónico + anidrido acético + ácido sulfúrico	Verde
ZLATIS, ZAK e BOYLE [2, 5, 6, 7, 21, 23]	1953	Ácido acético + cloreto férrico + ácido sulfúrico	Vermelho
SEARCY e BERGQUIST [4, 6, 31]	1960	Ácido acético + sulfato de ferro + ácido sulfúrico	Vermelho

Tanto nas reacções em que se obtém uma coloração verde, (LIEBERMAN, BOUCHARD, etc.) como naquelas em que se produz uma cor vermelha, (SALKOWISKY, etc.) estão descritos compostos intermediários derivados do colesterol por desidratação em posição 3 e condensação de duas moléculas. Nas reacções características pela sua cor verde, é a concentração moderada de ácido sulfúrico que condiciona os produtos finais, denominados «halocromos», provavelmente constituídos por derivados condensados do colesterol, insaturados e monosulfonados [3]. Quando, inversamente, as reacções são conduzidas em concentração elevada do ácido sulfúrico, os «halocromos» correspondentes apresentam cor vermelha, e supõe-se serem derivados condensados, insaturados e disulfonados [3].

A inclusão de iões metálicos, como o Zn^{2+} e Fe^{3+} , parece catalizar [3] as reacções de formação e estabilização dos compostos corados, sendo invocados mecanismos oxidativos estequiométricos nas reacções com o Fe^{3+} [6, 15].

De todas as reacções de coloração, a clássica LIEBERMAN-BOUCHARD é uma das mais divulgadas; contudo, as reacções do cloreto férrico — ácido sulfúrico, de difusão mais recente, apresentam, também numerosas referências.

1.3 — CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS

São muitos os métodos de doseamento espectrofotométrico do colesterol e incontáveis os trabalhos publicados a tal respeito; todavia, podemos agrupá-los consoante o número de etapas existentes na sua técnica. Assim, esquematizaremos quatro grupos, referenciados com vários métodos, que julgamos representativos.

1.4 — EXTRACÇÃO DO COLESTEROL

As reacções de coloração, quando efectuadas no próprio soro ou plasma sem qualquer fase de purificação, originam produtos finais corados instáveis [1, 3]. As proteínas ou os produtos da sua desagregação podem ocasionar interferências diversas, que, geralmente, se acentuam ainda mais com as temperaturas elevadas a que são sujeitas durante a fase de desenvolvimento da cor [3].

A extracção do colesterol, usualmente efectuada com dissolventes orgânicos, eliminando o factor proteico, corrige essas deficiências.

A dissociação total do complexo lipídico-proteídico é uma condição indispensável para que a extracção se realize com rendimento absoluto [6]. Normalmente, os solventes desnaturam as proteínas séricas e desencadeiam a sua precipitação [6].

Uma das misturas mais usadas nas técnicas é a de etanol-éter que realiza uma extracção completa, a frio, e em pouco tempo [6, 16, 17]. Contudo, outros solventes têm sido preconizados pelo seu valor, tais como: acetona, ácido acético, isopropanol [32] acetona-etanol [31], acetato de etilo-etanol [1, 23].

Número de etapas dos métodos	Autores do método	Data	Reacção de coloração
a) Determinação directa			
1) reacção corada	ZLATKIS [2, 5, 7, 21]	1953	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
	PEARSON [3, 6, 24]	1953	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄
	FERRO e HAM [2, 6]	1960	LIEBERMAN-BOUCHARD
	WATSON [4, 25]	1962	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄
	RICHTERICH [4]	1962	CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄
b) Métodos com duas etapas			
1) extracção	BLOOR [2, 6, 10, 16, 46]	1916	LIEBERMAN-BOUCHARD
2) reacção corada	SACKETT [7]	1925	LIEBERMAN-BOUCHARD
	CARR e DREKTER [2, 3, 29]	1956	LIEBERMAN-BOUCHARD
	HENLY [6]	1957	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
	KLUNGSÖYR [1, 5, 6, 23, 46]	1958	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
	SEARCY e BERGQUIST [31]	1959	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
	CRAWFORD [17]	1959	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
	LEFFLER [8, 9, 32]	1959	Fe cl ₃ + H ₂ SO ₄
c) Métodos com três etapas			
1) saponificação	ABELL [1, 2, 3, 6]	1952	LIEBERMAN-BOUCHARD
2) extracção	TRINDER [4]	1952	LIEBERMAN-BOUCHARD
3) reacção corada	ANDERSON [4]	1956	LIEBERMAN-BOUCHARD
	MANN [4]	1961	LIEBERMAN-BOUCHARD
d) Métodos com quatro etapas			
1) extracção	SCHOENHEIMER e SPERRY [2, 6, 7]	1934	LIEBERMAN-BOUCHARD
2) saponificação	SPERRY e WEB [1]	1950	LIEBERMAN-BOUCHARD
3) isolamento	COLMAN e Me PHEE [4]	1956	LIEBERMAN-BOUCHARD
4) reacção corada	BROWN [4]	1961	LIEBERMAN-BOUCHARD

1.5—SAPONIFICAÇÃO DOS ESTERES DO COLESTEROL

A etapa de saponificação, que converte a fracção esterificada do colesterol em colesterol livre, elimina os erros provenientes dum eventual maior desenvolvimento de cor do colesterol esterificado em relação ao livre.

A hidrólise dos ésteres é, vulgarmente, realizada a quente com hidróxido de potássio alcoólico [6].

1.6—ISOLAMENTO SELECTIVO POR PRECIPITAÇÃO PELA DIGITONINA

As reacções de coloração do colesterol, não sendo totalmente específicas, podem falsear os valores dos doseamentos quando na presença de certos constituintes cromogéneos.

O isolamento selectivo, por precipitação pela digitonina, após saponificação, separando o colesterol da generalidade dos outros componentes, elimina as interferências dos diversos cromogéneos inespecíficos [2, 3, 6].

A reacção de formação dos digitonidos reúne os requisitos necessários para realizar um isolamento absoluto. A ligação é muito específica, obtendo-se somente com os esteróis naturais β -hidroxilados e não havendo qualquer interferência com os α -hidroxilados nem com os ésteres que, naturalmente, não possuem a sua função oxidrúlica livre [6]. Além disso, o complexo equimolecular digitonina-colesterol é muito insolúvel na maior parte dos solventes [33] mas, facilmente, cindível pela piridina ou pelo anidrido acético, o que facilita a recuperação do colesterol [6].

1.7—A REACÇÃO DE LIEBERMAN-BOUCHARD E AS TÉCNICAS QUE A UTILIZAM

A reacção clássica de coloração de LIEBERMAN-BOUCHARD, que é seguida em numerosos métodos de determinação do colesterol, apresenta uma natureza bastante complexa que é, naturalmente, influenciada por diversos factores como a concentração do ácido sulfúrico, a presença de água, o conteúdo de ácido acético no anidrido acético, o tipo de solvente utilizado, o tempo de reacção, o efeito da luz, a temperatura, etc. [6].

Nesta reacção, os diferentes graus de coloração, desenvolvidos pelo colesterol esterificado em relação ao livre, são influenciados pelo dissolvente, tornando-se muito acentuados com o uso de extractos colorofórmicos [2, 4, 6, 29, 30].

Os interferentes lipocrómicos parecem acusar uma maior absorção nas zonas azul-verde das leituras espectrofotométricas do que nas bandas vermelhas de outras reacções de coloração [34]. Também os derivados do colesterol, normalmente existentes nos soros sanguíneos, como o colestanol, o Δ 7-colestenol e o 7-de hidrocolesterol e, ainda, os produtos metabólicos de medicamentos, como o desmos-

tenol ou 24-de-hidrocolesterol, revelam-se com uma coloração maior nesta reacção do que nas do cloreto férrico-ácido sulfúrico [6].

A reacção de coloração, de LIEBERMAN-BOUCHARD, quando é efectuada directamente no soro sem prévia extracção ou outras fases purificadoras, como nos métodos de FERRO e HAM e de HUANG, determina resultados que se têm mostrado pouco satisfatórios, pois os valores são, falsamente, elevados, sendo ainda, encontrados erros vultuosos quando se trata de soros lipémicos, hemolisados e ictericos [6].

Os métodos que usam a reacção de LIEBERMAN-BOUCHARD e que se apresentam mais divulgados são o de BLOOR [2, 6, 10, 16, 46], ABELL [1, 2, 3, 6] e SHOENHEIMER e SPERRY [2, 6, 7], incluindo-se ainda as suas ultteriores modificações por DRECKER [2, 3, 29], ANDERSON [4] e SPERRY e WEB [1].

O método de SCHOENHEIMER e SPERRY, efectuando uma extracção, uma saponificação e um isolamento selectivo que separa o colesterol de constituintes eventualmente interferentes, apresenta uma técnica muito perfeita, considerada de eleição para fins científicos e que, normalmente, é aconselhada para todos os processos de referência.

O método de ABELL, realizando uma extracção e uma saponificação, é também uma técnica muito valiosa.

O método de BLOOR, com um passo extractivo desproteinizante, é um método clássico (popular do uso) de aplicação à clínica, embora, se lhe apontem defeitos, nomeadamente pelo uso de extractos clorofórmicos.

1.8—O ÁCIDO P-TOLUENOSULFÓNICO E AS TÉCNICAS QUE O UTILIZAM

PEARSON, STERN e McGAVAC [3, 24] apresentaram uma técnica na qual a reacção de coloração se desenvolve, directamente, no soro sem extracção prévia, conseguindo-se uma solubilização ou suspensão das proteínas pelo ácido p-toluenosulfónico. A inclusão de um branco complementar, constituído pela mistura oxidante e o soro, foi preconizada com o fim de corrigir eventuais interfeerências [6, 45]. A substituição do ácido p-toluenosulfónico pelo congénere 2,5-dimetilbenzenosulfónico foi, ulteriormente, aconselhada por WATSON [4, 25].

Estas técnicas, de base simples, atraíram as atenções gerais e adquiriram grande popularidade em todo o mundo; contudo, as apreciações sobre o valor das determinações são divergentes e discordantes manifestando os autores cautelosos ainda um certo cepticismo pelos métodos directos [6, 29, 35].

1.9—A REACÇÃO DE COLORAÇÃO DO CLORETO FÉRRICO-ÁCIDO SULFÚRICO E AS TÉCNICAS QUE A UTILIZAM

A reacção de coloração do colesterol desencadeada com cloreto férrico-ácido sulfúrico, desenvolve «halocrómos» ou sais «halocrómi-

cos» cujo grupo cromóforo revela uma coloração roxo-púrpura [3, 5, 6, 31]. A reacção apresenta uma elevada sensibilidade, que é cerca de cinco vezes maior que a da coloração de LIEBERMAN-BOU-CHARD [18], e possui, ainda, a vantagem de não originar desigualdades de cor sensíveis consoante o colesterol está esterificado ou livre [6].

ZLATIC, ZAK e BOYLE ensaiaram o processo de coloração, directamente, no soro sanguíneo, atribuindo-lhe exactidão e reproductibilidade [21]. Todavia, a técnica directa, estudada minuciosamente por diversos autores, não se mostrou satisfatória revelando interferências e determinando valores elevados [6].

Foram propostas diversas modificações que incluem, normalmente, uma prévia fase extractiva. HENLY e HENRY [6] escolheram para o passo desproteínizante a própria solução acética do cloreto férrico, SEARCY e BERGQUIST [31] indicarem a mistura etanol-acetona, CRAWFORD [17] propôs a solução etanol-éter, LEFFLER [32] usou o isopropanol e KLUNGSÖYR [1, 5, 6, 23] preconizou a mistura acetato de etilo-etanol.

Surgiram, com estes princípios fundamentais, métodos altamente valiosos [16]; entre eles, a técnica de KLUNGSÖYR, muito referenciado pela sua simplicidade e valor, é preconizada para uso em análises clínicas [1].

1.10 — FRACÇÕES DO COLESTEROL LIVRE E ESTERIFICADO

Nas considerações tecidas até aqui referimos o colesterol como colesterol total que, naturalmente, é a soma das fracções colesterol livre e esterificado.

Como fonte de diagnóstico clínico pode interessar a relação entre o valor da fracção esterificada ou livre e o valor do colesterol total que dará indicações sobre o estado da função hepática.

O fundamento das técnicas de doseamento das fracções do colesterol baseia-se, normalmente, na reacção de precipitação selectiva e quantitativa pela digitonina que, retendo o colesterol livre no complexo insolúvel, o separa do colesterol esterificado.

A determinação do colesterol livre ou dos seus ésteres resulta da harmoniosa conjugação e enquadramento dessa fase separativa com as técnicas usadas no doseamento do colesterol total.

1.11 — SELECÇÃO DOS MÉTODOS

Os métodos que efectuam a totalidade dos passos revelam-se os mais exactos e, portanto, são os escolhidos para fins científicos. Todavia, como meios auxiliares do diagnóstico clínico, foram preferidas as técnicas mais simples.

Nestes últimos tempos generalizou-se, por todo o mundo, o uso das técnicas directas mas, provavelmente, sem razão devido aos sérios inconvenientes descritos.

O método clássico de BLOOR, com uma extracção pela mistura etanol-éter e uma reacção de coloração verde e LIEBERMAN-BOU-

CHARD, foi durante muitos anos seguido no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Militar Principal.

Entre os processos do seu tipo, o método de KLUNSÖYR, com um passo extractivo realizado pela mistura acetato de etilo-etanol e uma reacção de coloração roxo-púrpura de ZLTKIS, ZAK e BOYLE gerada com cloreto férrico, é apontado como o melhor [1].

Em conformidade com os propósitos que nos moveram, naturalmente que as nossas observações terão como principais objectivos o método clássico de BLOOR, o método do cloreto férrico de KLUNG-SÖYR e, ainda, um consagrado método directo, o de PEARSON, modificado por WATSON.

II — PARTE EXPERIMENTAL

2.1 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL SEGUNDO O MÉTODO DE BLOOR

O método clássico de BLOOR, 1916 [2, 10, 16, 46], é, provavelmente, dos mais antigos mas, apesar disso, ainda hoje referido pelo seu valor.

a) *Fundamento*

A fase extractiva é efectuada com uma mistura etanol-éter, rejeitando-se o componente proteico por filtração. Uma alíquota do filtrado é evaporada à secura sendo feita a extracção do resíduo com clorofórmio. No extracto clorofórmico é realizada a reacção de coloração, com anidrido acético e ácido sulfúrico, cuja leitura no espectrofotómetro traduz a valorização do colesterol.

b) *Técnica*

Este método é o resultante da simplificação do original [2, 10, 16].

- 1) Numa proveta de rolha de vidro ou polietileno introduza 9,5 ml da mistura etanol-éter.
- 2) Adicione 0,500 ml de soro, gota a gota.
- 3) Rolhe a proveta e agite durante um minuto, evitando a formação de grumos.
- 4) Deixe em repouso durante trinta minutos.
- 5) Filtre por papel de filtro isento de gordura, com as necessárias precauções para evitar a evaporação.
- 6) Pipete 5,000 ml do filtrado para um copo e evapore a 37°C.
- 7) Faça a extracção do resíduo com 5 ml de clorofórmio e mantenha os recipientes a 25°C.
- 8) Junte 2,0 ml de anidrido acético e misture.
- 9) Adicione, lentamente, 0,100 ml de ácido sulfúrico concentrado, deixando-o escorrer pelas paredes perto da solução. Misture.
- 10) Deixe desenvolver a cor no escuro durante vinte e cinco minutos exactamente cronometrados.
- 11) Efectue, imediatamente, as leituras no espectrofotómetro em 660 $m\mu$ em relação a um branco previamente preparado.

c) *Reagentes e Material* [2, 10]

- 1 — Mistura etanol-éter: 3 partes de álcool etílico absoluto e uma parte do éter anidro (v/v). Prepare na ocasião.
- 2 — Clorofórmio.
- 3 — Anidrido Acético.
- 4 — Ácido sulfúrico concentrado.
- 5 — Papel de filtro isento de gordura. Obtém-se por lavagem com éter e secagem.
- 6 — Material de vidro, rigorosamente seco.

Nota — O espectrofotómetro usado na totalidade dos ensaios foi o Coleman Júnior II, modelo 6/20.

d) *Aferição do método*

d₁) Traçado da curva padrão segundo o método clássico: 2, 10

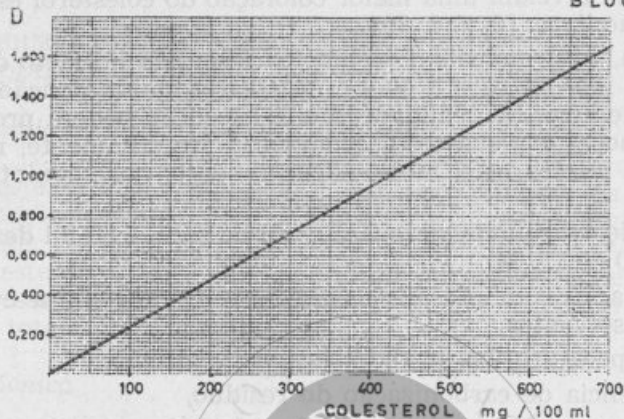
- 1 — Prepare as seguintes soluções tipo, pesando, cuidadosamente, as quantidades de colesterol indicadas no quadro e introduzindo as cinco primeiras em balões aferidos de 500 ml e as quatro últimas em balões aferidos de 250 ml.
- 2 — Dilua e complete o volume com clorofórmio a 20° c.
- 3 — Os padrões pesam-se, em vez de se medirem, porque o clorofórmio é difícil de pipetar correctamente.

Miligramas de colesterol	Miligramas de colesterol em 5 ml	Miligramas de colesterol por 100 ml, em soro
20	0,2	80
40	0,4	160
60	0,6	240
80	0,8	320
100	1,0	400
60	1,2	480
70	1,4	560
80	1,6	640
90	1,8	720

Com o volume de 5 ml de cada padrão proceda como está descrito na técnica de 7 a 11.

- 4 — Efectue o número suficiente de determinações de cada concentração de forma que os valores médios registados traduzam uma recta.

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL segundo o método de
BLOOR



Esta curva padrão foi elaborada segundo as indicações do método clássico. [48]

d₂) Confirmação de valores

Padrões em solução acética revelaram-se úteis, apresentando elevada estabilidade e possibilitando medições volumétricas rigorosas. [48]

As confirmações com padrões acéticos de 200 mg/100 ml e ainda outras soluções aferidas de 400 mg/100 ml determinaram uma coincidência e sobreposição de valores. [48]

e) Valores normais

150 — 250 mg/100 ml [2]

Discriminaremos ainda:

homens: 150 — 250 mg/100 ml [10]

mulheres: 180 — 260 mg/100 ml [10]

f) Comentários

Naturalmente, como em todos os métodos de doseamento de colesterol, a presença de água no material e reagentes, atenuando o desenvolvimento de coloração, constitui uma dificuldade. [2, 4, 6, 10, 48] A própria hidratação do ácido sulfúrico é assinalável. [48]

O método de BLOOR, apesar de não possuir etapa de isolamento selectivo, é pouco criticável com base na falta de especificidade da reacção de coloração, possivelmente, fundamentado nos dois passos extractivos. [2, 4, 16] Mas apresenta acentuados os inconvenientes da

ausência de saponificação ampliados pelo próprio uso de extractos clo-rofórmios que revelam uma maior coloração do colesterol esterificado em relação ao livre. [2, 4, 6, 30]

Todavia, os principais comentários assentam no facto de possuir uma técnica morosa para a qual é necessária muita atenção às diversas causas de erro. Na realidade, a sua execução poderá prolongar-se por várias horas e a sua técnica deve ser, rigorosamente, respeitada em diversos pontos mas, muito especialmente, nos seguintes:

- 1) Medições volumétricas (0,500 ml de soro, 5,00 ml de filtrado e 0,100 de H_2SO_4).
- 2) Filtração com precauções tendentes a impedir a evaporação dos solventes.
- 3) Temperatura das evaporações.
- 4) Ausência de carbonização do resíduo.
- 5) Tempo de desenvolvimento da coloração no escuro.
- 6) Rapidez da execução da leitura espectrofotométrica.

De todos estes parâmetros, o último merece especial consideração. Assim, determinando a influência do atraso de dez minutos na leitura espectrofotométrica em padrões e soros verifica-se forte diminuição da coloração, originando-se erros superiores a 10%, referidos à percentagem de colesterol. [48] E para vinte minutos, uma redução da ordem de 20%. [48]

Assim o registamos:

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL segundo BLOOR

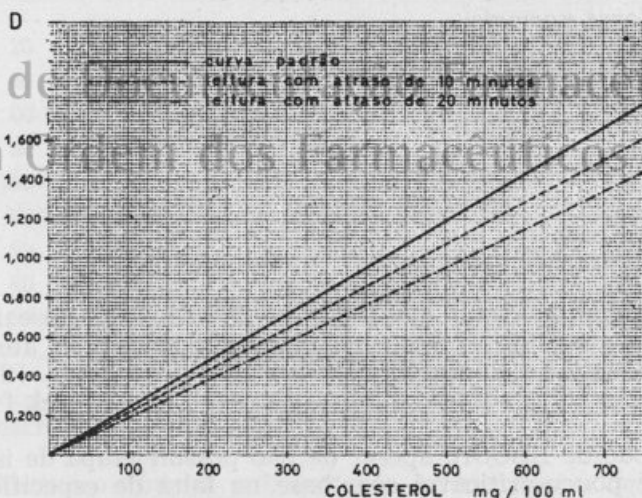


Fig. 3

Comprova-se a pouca estabilidade dos «halocromos» das reacções coradas. [46, 48]

2.2 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL ESTERIFICADO SEGUNDO O MÉTODO DE BLOOR

a) *Fundamento* [2, 10]

O colesterol livre é separado e rejeitado com base na sua reacção de combinação com a digitonina que forma colesterol digitónico insolúvel no éter do petróleo.

O colesterol esterificado é extraído pelo éter do petróleo e, no resíduo desse extracto, é retomada a técnica da determinação do colesterol total.

b) *Técnica*

- 1) Prepare o extracto do soro em etanol-éter pelo mesmo processo indicado na determinação do colesterol total (1, 2, 3, 4 e 5).
- 2) A 5,00 ml de filtrado adicione 0,5 ml de solução de digitonina e evapore a 37° C.
- 3) Sobre o resíduo seco faça uma extracção com 3,0 ml do éter do petróleo aquecendo, ligeiramente, sobre um banho de areia. Faça mais duas extracções idênticas e reúna os extractos.
- 4) Evapore os extractos até à secura.
- 5) Extraia o resíduo com 5,0 ml de clorofórmio e continue os ensaios como está descrito para a determinação do colesterol total (8, 9, 10, 11).

c) *Reagentes e material*

- 1 — Os mesmos da determinação do colesterol total.
- 2 — Éter de petróleo.
- 3 — Solução de digitonina a 1%.

Introduza 1 g de digitonina num matraz aferido de 100 ml e dissolva em cerca de 50 ml de etanol a 45%, aquecendo ligeiramente. Dilua até completar o volume de 100 ml com etanol a 45%.

O reagente mantém-se estável algumas semanas. [48]

d) *Valores normais*

70 - 75% do colesterol total [10]

e) *Considerações*

A fase separativa da determinação do colesterol livre está subordinada às características do método de determinação do colesterol total.

Em todas as determinações do grau de esterificação do colesterol, o estado de conservação dos soros sanguíneos assume importância especial, pois os valores estão condicionados por diversos factores, onde tomam vulto as reacções enzimáticas, desencadeadas pela colesterol-esterase [42] existente no soro, que podem elevar o teor dos ésteres. [6]

2.3 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL SEGUNDO O MÉTODO DIRECTO DE PEARSON E WATSON

O método directo de PEARSON, STERN, MAC GAVACK, [3, 6, 24] e WATSON [4, 25], apontado por muitos como o melhor método directo, [3, 4] teve uma notável expansão em todo o mundo.

É, usualmente, seguido por diversos fabricantes de reagentes que o industrializaram em ensaios rápidos. [4, 43, 44, 45]

a) *Fundamento* [4]

No método de PEARSON adiciona-se, directamente ao soro, ácido acético glacial, anidrido acético, ácido 2,5 dimetilbenzenosulfónico e ácido sulfúrico e determina-se a coloração obtida a 575 m μ . O anidrido acético extrai o colesterol, assegura a manutenção do meio anidrido e precipita as proteínas que serão dispersas pelo ácido dimetilbenzenosulfónico. Com os três primeiros reagentes produz-se uma reacção exotérmica, por desidratação das proteínas, que moderará o aquecimento verificado pela adição do ácido sulfúrico.

O ácido p-toluenosulfónico do método original foi substituído, por WATSON, pelo 2,5-dimetilbenzenosulfónico, pois as impurezas desse produto originavam explosões. [26]

b) *Técnica* [4]

Tomadas de ensaio	Problema A	Branco br	Padrão S
Reagente do colesterol (ml)	5,0	5,0	5,0
Soro (ml)	0,1	—	—
Água desmineralizada (ml)	—	0,1	—
Padrão (ml)	—	—	0,1

Misture. Coloque em água fria durante cinco minutos.

Ácido sulfúrico concentrado, gota a gota e agitando até dissolver o precipitado (ml)	1,0	1,0	1,0
--	-----	-----	-----

A leitura efectua-se quinze minutos depois a 560-590 $m\mu$ em relação à água destilada.

A determinação deve estar efectuada 45 minutos após a adição do ácido sulfúrico.

Cálculo:

$$\text{mg do colesterol/100 ml} = \frac{D(A) - D(\text{br})}{D(S) - D(\text{br})} \times 400$$

Nota — Não incluímos o ensaio em branco de mistura oxidante e soro, com o fim de não alterar a simplicidade do método descrito.

c) *Reagentes* [4]

1 — Reagente do colesterol

Dissolva 5,6 g do ácido 2,5-dimetilbenzenosulfónico di-hidratado em ácido acético glacial e dilua até 100 ml. Junte 300 ml de anidrido acético e 100 ml de ácido acético glacial.

Conserva em frasco bem rolhado. A solução é estável vários meses à temperatura ambiente.

2 — Padrão de colesterol — 400 mg/100 ml em ácido acético glacial.

As preparações de comércio do colesterol costumam conter 20% de impurezas. Portanto, o colesterol deve ser recristalizado várias vezes em etanol e bem seco.

Dissolvem-se 400 mg de colesterol no ácido acético glacial e dilui-se até 100,0 ml. A estabilidade é ilimitada.

3 — Ácido sulfúrico concentrado.

d) *Aferição do método*

O valor médio da leitura $D(S) - D(\text{br})$, correspondente ao padrão preconizado pelo método, foi determinado. $D(S) - D(\text{br}) = 0,241$.

A curva padrão do método foi determinada com várias soluções acéticas aferidas. [48]

Data	D(S) - D(br)
28 JUL	0,23
15 AGO	0,252
31 AGO	0,215
31 AGO	0,221
2 SET	0,268

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL segundo o método
directo de PEARSON

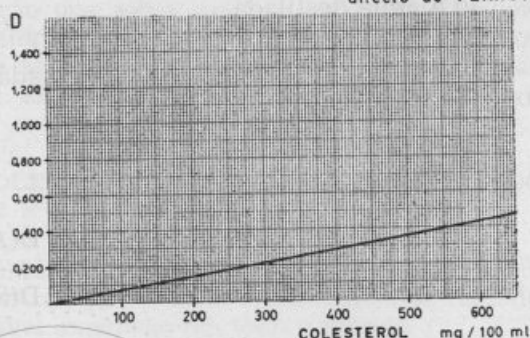


Fig. 4

e) *Valores normais* [4]

123 — 324 mg/100 ml — Adultos

f) *Comentários*

O método directo de PEARSON tem, inegavelmente, uma técnica de execução muito rápida, de cerca de trinta minutos, e apresenta poucos notórios os inconvenientes da desigualdade de coloração do colesterol livre e esterificado, apesar de não integrar uma etapa de saponificação. [24, 29]

Todavia, a reacção de coloração, sem qualquer fase purificadora ou de isolamento selectivo, é bastante influenciada por cromogéneos inespecíficos, como a hemoglobina [4, 6, 45, 48], a bilirrubina [4, 6, 45, 48] e ainda em menor grau o dihidrocolestenol [27], o Δ 7-colestenol [28] e o desmosterol [4]. Mas as maiores interferências serão, provavelmente, motivadas pela influência das proteínas que, além do mais, ficam submetidas a temperaturas elevadas na fase de adição do ácido sulfúrico [3]. A ausência de um passo extractivo desproteinizante é, verdadeiramente, criticável. [1, 3]

Contudo, a estabilidade das reacções coradas é suficiente para efectuar as leituras, verificando-se que a valorização espectrofotométrica não sofre modificação sensível mesmo quando analisada vinte e cinco minutos após o início proposto. [48]

A inclinação da curva do método está condicionada pelo comprimento de onda da leitura, que não coincide com a banda de maior absorção para evitar zonas de instabilidade. [4]

2.4 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL LIVRE INTEGRADA NO MÉTODO DIRECTO DE PEARSON, SEGUNDO WINDAUS [4]

a) *Fundamento*

A determinação baseia-se no método do colesterol total.

O colesterol livre é, previamente, precipitado e separado pela digitonina.

b) *Técnica* [4]

1) Precipitação pela digitonina.

Tomadas de ensaio	Problema A	Testemunha Ba
Soro, plasma (ml)	0,1	0,1
Álcool isopropílico (ml)	—	1,0
Solução de digitonina (ml)	1,0	—
Deixe repousar durante dez minutos. Centrifugue. Decante o líquido sobrenadante. Adicione ao resíduo 5 ml de acetona em jacto a fim de homogeneizar a mistura. Se necessário use vareta de vidro. Centrifugue. Decante o líquido sobrenadante e seque no vácuo.		
	A	Ba
Resíduo seco	++	++
Reagente do colesterol	2,5	2,5

Agite bem o precipitado com vareta de vidro e centrifugue.

2) Determinação.

Tomadas de ensaio	Problema A	Testemunha Ba	Branco br	Padrão S
Líquido sobrenadante (ml)	1,0	1,0	—	—
Reagente do colesterol (ml)	—	—	1,0	1,0
Solução padrão (ml)	—	—	—	0,02
Ácido acético glacial (ml)	—	—	0,02	—
Deixe durante cinco minutos à temperatura ambiente.				
	A	Ba	br	S
Ácido sulfúrico concentrado (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2

Adicione o ácido sulfúrico a cada tubo, separadamente, agitando o conteúdo até que o precipitado se dissolva.

Determine a densidade óptica entre dez e vinte minutos a 560-580 m μ em relação à água destilada.

3) Cálculo do colesterol livre:

$$\frac{D(A) - D(ba)}{D(S) - D(br)} \times 201,5 \text{ (mg/100 ml)}$$

4) Cálculo do colesterol esterificado.

Colesterol esterificado = colesterol total - colesterol livre.

c) *Reagentes* [4]

- 1 — Reagentes de terminação do colesterol total.
- 2 — Álcool isopropílico.
- 3 — Acetona
- 4 — Ácido acético glacial.
- 5 — Solução de digitonina.

Dissolva 250 mg de digitonina em 100 ml de álcool isopropílico.

d) *Valores normais* [4]

Colesterol livre: 20-40 % do colesterol total.

Colesterol esterificado: 60-80 % do colesterol total

e) *Considerações*

A determinação do colesterol livre, integrada no método directo de PEARSON, apresenta, além da precipitação e separação pela digitonina, outra fase motivada pela insolubilidade do sedimento no reagente do colesterol.

A inclusão de ensaios com soros testemunhas, que se destinam a corrigir eventuais interferências dos soros não desproteinizados, aumenta ainda mais o número de passos. Essa numerosa sequência de intervenções laboratoriais constitui um contraste saliente com a simplicidade do método directo.

A determinação do colesterol esterificado, também enquadrada no método directo de PEARSON, foi objecto de estudo de vários autores, nomeadamente, de FRIED, mais ainda não temos conhecimento do teor do seu trabalho que supomos não publicado.

2.5 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL SEGUNDO O MÉTODO DO CLORETO FÉRRICO DE KLUNGSÖYR

O método de KLUNGSÖYR [1, 5, 6, 23, 24], de execução fácil, é preconizado para análises de aplicação à clínica pelos melhores autores modernos.

a) *Fundamento*

O colesterol extrai-se com a mistura de dissolventes, acetato de etilo-etanol, regeitando-se o componente proteico por centrifugação. Numa alíquota do extracto é efectuada a reacção de coloração, com ácido acético, ácido sulfúrico e cloreto férrico, que será valorizada espectrofotométricamente.

b) *Técnica* [1]

- 1 — Num tubo de centrifuga vulgar introduza 5 ml da solução de acetato de etilo-etanol.
- 2 — Adicione 0,500 ml de soro e misture.
- 3 — Centrifugue a alta velocidade durante cinco minutos.
- 4 — Retire uma alíquota de 0,600 ml do extracto sobrenadante para um tubo de ensaio vulgar.
- 5 — Adicione 2,0 ml do reagente do cloreto férrico. Misture.
- 6 — Adicione 2,0 ml do ácido sulfúrico. Misture repetidas vezes, tendo em atenção a viscosidade do meio.
- 7 — Deixe arrefecer a solução até ficar à temperatura ambiente e leia a densidade óptica em relação ao branco em 550 m μ .

c) *Reagentes* [1]

- 1 — Solução de acetato de etilo-etanol 1 : 1 (V/V).
- 2 — Reagente do cloreto férrico.

Dissolva 0,7 g de cloreto férrico hexa-hidratado em ácido acético glacial. Efectue a pesagem o mais rapidamente possível pois o componente é higroscópico. Dilua até 1000 ml com ácido acético glacial misturando a solução. Conserve em frasco escuro (se possível topázio):

A solução é estável várias semanas (4-6 pelo menos) [5, 48].

- 3 — Padrão do colesterol.

Dissolva 100 mg do colesterol em 100 ml da solução etanol-acetato de etilo.

- 4 — Ácido sulfúrico (reagente analítico).

d) *Aferição do método* [1]

- 1 — Pipete 0,00; 0,500; 1,000; 1,500; 2,00 e 2,500 da solução padrão do colesterol para tubos de ensaio e dilua cada um deles até 5,0 ml com a solução de acetato de etilo-etanol.

- 2 — Adicione 0,5 ml de solução do cloreto de sódio a 9 ‰.
- 3 — Pipete uma alíquota de 0,600 ml de cada um deles para outra série de tubos.
- 4 — Continue como está descrito para o colesterol total ou livre. Estes padrões representam 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/100 ml de colesterol.

Seguindo as indicações do método e usando ainda outras soluções acéticas aferidas determinámos:

Padrões	D - 1.ª série	D - 2.ª série	D - 3.ª série	D - média
100	0,29	0,27	0,28	0,28
200	0,57	0,54	0,55	0,555
300	0,85	0,80	0,84	0,835
400	1,13	1,10	1,11	1,11
500	1,35	1,42	1,40	1,39

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL segundo o método de KLUNGSÖYR

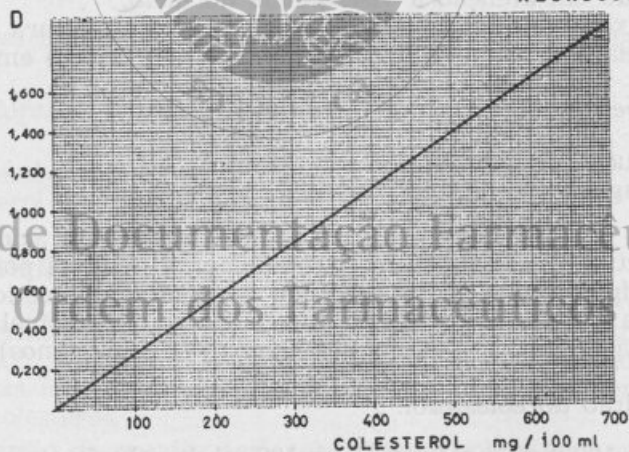


Fig. 5

A curva de calibração foi determinada, observando-se uma sobreposição dos valores da recta de regressão com os da curva encontrada segundo os processos gráficos habituais [47, 48]. Com o intuito de referenciar a precisão do método, referimos que os desvios obtidos nas diversas determinações com padrões não apresentaram amplitude notável [47, 48].

e) *Valores normais* [5]

220 ± 50 mg por 100 ml de soro, em adultos.

f) *Comentários*

O método de KLUNGSÖYR apresenta uma técnica simples, executável em menos de uma hora que realiza a reacção de coloração, directamente numa alicota do próprio extracto, após a desproteïnização, sem necessidade de recorrer a ebulição ou evaporação [48].

Na reacção de coloração obtém-se um sal «halocrómico» [5, 6, 31] cujo grupo cromóforo, de cor púrpura, é sensível, estável e reprodutível [1, 5, 17, 18] tendo-se verificado que leituras espectrofotométricas, desfasadas de uma hora, não revelam variação assinalável [48].

A ausência de saponificação não é notada, pois os erros motivados pelas diferentes colorações das fracções esterificado e livre do colesterol, não são sensíveis [18, 19].

As principais interferências com as reacções de coloração são motivadas pelos brometos [5, 6, 20]. A bilirrubina só ligeiramente interfere, pois, além de possuir zonas de absorção desviadas [21], é parcialmente rejeitada na fase extractiva [5], e, ainda, transformada em biliverdina pelo Fe^{+} [22].

As problemáticas referidas para as determinações directas de ZLATIC, ZAK e BOYLE, com cloreto férrico e ácido sulfúrico, são eliminadas ou reduzidas pelo passo extractivo [6]. A hemoglobina [5, 6], o triptofano [5, 6], o piramido [6], a vitamina A [5, 36], a vitamina D [6], o salicilato de sódio [6], os nitratos [5], etc. não assumem importância como interferentes no método de KLUNGSÖYR.

2.6 — DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL LIVRE SEGUNDO O MÉTODO DO CLORETO FÉRRICO DE KLUNGSÖYR

a) *Fundamento*

O colesterol livre combina-se com a digitonina formando um precipitado complexo de colesterol digitónico que é isolado por centrifugação, decantação e subsequente lavagem com acetona.

A técnica continua, integrada nos passos da determinação do colesterol total.

b) *Técnica* [1]

1 — Introduza num tubo de ensaio 4,0 ml de solução de digitonina.

- 2 — Adicione 1,200 ml do extracto em acetato de etilo-etanol obtido na determinação do colesterol total. Misture bem. Deixe o sistema em repouso durante dez minutos e centrifugue a alta velocidade.
- 3 — Cuidadosamente, decante o líquido sobrenadante.
- 4 — Retome o resíduo em 4,0 ml de acetona, misture bem e recen- trifugue a mistura.
- 5 — Cuidadosamente, decante o fluído sobrenadante e absorva a acetona das paredes do tubo com papel de filtro.
- 6 — Suspenda o precipitado em 0,6 ml de mistura acetato de etilo-etanol. Junte 2,0 ml do reagente de cloreto férrico, misturando até dissolver o precipitado.
- 7 — Adicione 2,0 ml de ácido sulfúrico, misture bem e complete a técnica como foi descrito para a determinação do coles- terol total.

c) *Reagentes* [1]

- 1 — Os mesmos usados para a determinação do colesterol total.
- 2 — Acetona.
- 3 — Solução de digitonina.

Dissolva 1 g de digitonina em 50 ml de etanol.

Dilua para 100 ml com água destilada, misturando comple- tamente.

A solução é estável à temperatura ambiente durante mais de um mês [5, 48].

d) *Valores normais*

22-30 % do colesterol total [6].

e) *Considerações*

A fase separativa do colesterol livre, efectuada pela digitonina, está integrada na sequência do método da determinação do coles- terol total.

2.7 — VALORES NORMAIS DE COLESTEROL TOTAL SÉRICO

Os valores normais do colesterol total sérico são condicionados por diversas variáveis, entre as quais se assinala, com maior relevo, o sexo e a idade [1, 2, 3, 5, 6]. Mencionaremos um quadro [6, 37] que discrimina valores normais considerados como números dese- jáveis [6].

Colesterol total (mg/100 ml) [37]

Idade	Homens	Mulheres
20	110-250	110-250
30	120-290	120-290
40	135-315	135-290
50	150-340	145-330
60	140-321	156-356
70	140-310	?

A alimentação, especialmente, quando rica em «gorduras» [1, 6, 38], também é um factor influenciador das determinações do colesterol total, mas o estado do esforço ou repouso [6, 39], as flutuações climáticas [6, 40] e as próprias fases do ciclo menstrual [6, 41], podem igualmente ter interferência.

2.8— VALORES COMPARATIVOS DE DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL EM SOROS

As determinações do colesterol total, que apresentamos, foram efectuadas com soros colhidos, diariamente, no laboratório de análises clínicas do Hospital Militar Principal.

Representamos os valores finais referidos a mg/100 ml de colesterol total.

a) *Desvios dos Métodos*

Em face de uma enorme gama de determinação tornou-se necessário calcular e registar os valores das oscilações dos métodos possibilitando uma interpretação e esclarecimento em bases mais seguras.

Nessas condições, registamos os valores das percentagens dos desvios das valorizações dos métodos de BLOOR e de PEARSON em relação aos de KLUNGSÖYR, considerando-o como referência apenas a título de exemplo, e porque nos pareceu mais regular nas suas determinações.

Ref. ^a	Obs.	KLUNGSÓYR	BLOOR (Desvio ‰)	PEARSON (Desvio ‰)
2 SET - A	PR	198	204 (+3)	210 (+6)
2 SET - B	PR	260	259 (-0,3)	288 (+11)
2 SET - D	PR	248	259 (+4)	290 (+17)
3 SET - D	PA	355	362 (+2)	395 (+11)
4 SET - B ¹	PA	210	220 (+5)	190 (-10)
4 SET - I	PA	245	245 (0)	248 (+1)
8 SET - E ₁	BI	222	240 (+8)	375 (+69)
8 SET - E ₂	BI	280	300 (+7)	355 (+27)
8 SET - C ₁	HE	158	160 (+1)	170 (+8)
8 SET - C ₂	HE	133	140 (+5)	180 (+35)
15 SET - A	PA	285	295 (+3,5)	285 (0)
15 SET - B	PA	265	270 (+1,9)	260 (-1,9)
15 SET - C	PA	213	212 (-0,5)	220 (+3,3)
15 SET - D	PA	275	267 (-2,9)	255 (-7,3)
15 SET - E	PA	280	270 (-3,6)	273 (-2,5)
15 SET - G	PA	298	291 (-2,3)	300 (+0,1)
15 SET - H	PA	275	258 (-6,2)	285 (+3,6)
15 SET - J	PA	225	213 (-5,3)	230 (+2,2)
15 SET - L	PA	190	179 (-5,8)	209 (+10)
15 SET - M	PA	210	195 (-7)	220 (+5)
19 SET - E ₁		702	—	960
19 SET - E ₂		625	—	878
19 SET - A		290	283	300
19 SET - B		265	287	300
19 SET - D		135	158	133
19 SET - F		183	198	210
21 SET - A		135	130	160
21 SET - B		207	218	198
21 SET - C		252	264	300
21 SET - D		190	190	210
24 SET		265	264	268
24 SET		290	287	300
24 SET		220	226	236

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

Ref. ^a	Obs.	KLUNGSÖYR	BLOOR (Desvio %)	PEARSON (Desvio %)
24 SET		290	280	295
25 SET		180	192	228
25 SET		190	189	199
30 SET		210	209	222
30 SET		215	212	215
30 SET		250	254	270
30 SET - BI		252	270	425
30 SET - HE		153	167	210
1 OUT - BI		280	298	520
1 OUT - BI?		260	259	278
1 OUT		135	140	165
1 OUT		209	210	195
1 OUT		270	260	292
2 OUT		253	260	273
—		—	—	—
7 OUT - I		355	361	390
27 OUT - IF		370 (+4)	380 (+5)	515 (+32)
7 OUT - 2		218	225	218
27 OUT - 2F		240 (+10)	237 (+5)	325 (+49)
7 OUT - 3		135	140	154
27 OUT - 3F		180 (-4)	140 (0)	143 (-7)
7 OUT - 4		260	259	280
27 OUT - 4F		272 (+5)	250 (-3)	305 (+8)

BI — Soros com teor elevado de bilirrubina

HE — » » » » » hemoglobina

F — » conservados no frigorífico vinte dias

NOTA: Aos preparadores senhores Amaro (PA), Reiçadas (PR) e Antunes agradecemos a valiosa colaboração em numerosas determinações.

Os registos gráficos foram elaborados indiscriminadamente, apenas seguindo a ordem cronológica das respectivas análises dos soros. Assim, apresentamos os esquemas dos primeiros conjuntos de valores que poderemos julgar representativos. (Fig. 6).

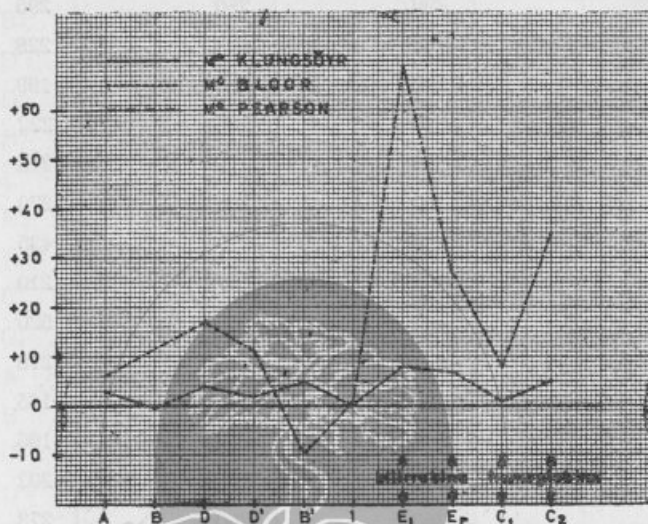


Fig. 6

Os desvios do método de BLOOR, em relação aos de KLUNGSÖYR, apresentam-se geralmente com valores moderados, mesmo em soros de teor elevado em hemoglobina e bilirrubina.

No método de PEARSON as oscilações revelam-se positiva e negativamente, em relação ao método de KLUNGSÖYR e BLOOR, encontrando-se, todavia, um predomínio dos desvios positivos acentuados, que tomam proporções excepcionais em soros com concentração anormal de hemoglobina e bilirrubina.

b) *Desvios em função do número de ordem da leitura espectrofotométrica*

Escolhemos, intencionalmente, uma sequência de valores correspondentes aos ensaios efectuados num dia de elevado número de análises, que, rotineiramente, são realizadas em série e não individualmente. (Fig. 7).

Tornou-se notório o desvio negativo e, sucessivamente, decrescente dos valores do método de BLOOR em função do número de ordem da série, muito provavelmente, motivado pelo atraso nas sucessivas leituras espectrofotométricas e que parece pôr em evidência a instabilidade das reacções da coloração.

Os desvios do método de PEARSON apresentaram um comportamento idêntico aos do esquema anterior, considerando a ausência de soros ictericos e hemolisados.

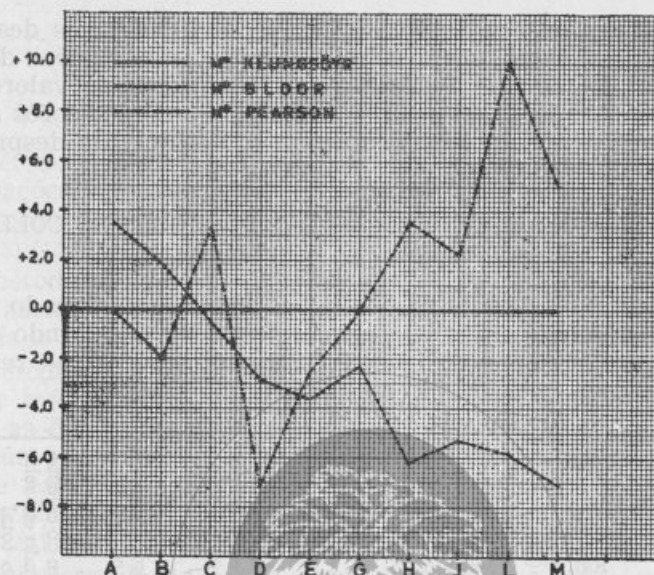


Fig. 7

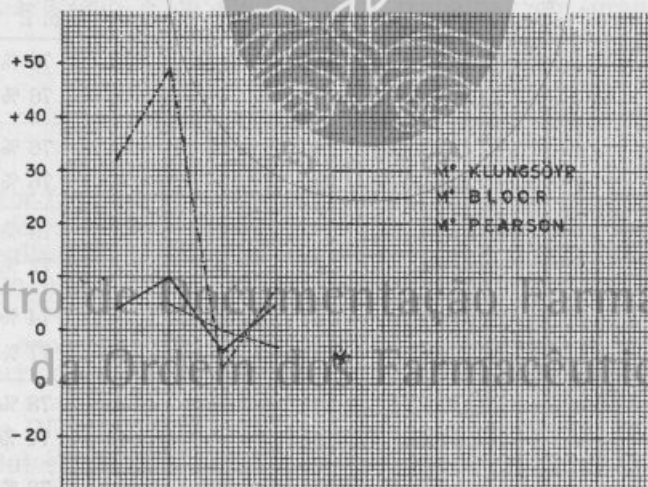


Fig. 8

c) *Desvios em função da conservação dos soros*

Com o objectivo de apreciar a influência do estado de conservação dos soros nas técnicas de determinação do colesterol total, esquematizamos os desvios dos valores registados em soros acondicionados no frigorífico, durante vinte dias, em relação às mesmas determinações efectuadas em soros recentes. (Fig. 8).

Nas determinações de KLUNGSÖYR e BLOOR, os desvios não foram apreciáveis tendo em conta as próprias oscilações dos métodos. Mas no método de PEARSON determinaram-se valores elevados, que revelam interferências dos constituintes dos soros alterados e, que, talvez, chamem a atenção para a ausência de desproteinização do método.

2.9 — VALORES DA DETERMINAÇÃO DAS FRACÇÕES DO COLESTEROL: LIVRE E ESTERIFICADO

Apresentamos determinações do colesterol esterificado, segundo o método clássico de BLOOR, e do colesterol livre, segundo o método do cloreto de férrico de KLUNGSÖYR, em soros, e as respectivas percentagens em relação ao colesterol total:

Data	Ref.	Método	Colesterol total mg/100 ml	Colesterol esterificado mg/100 ml	Colesterol livre mg/100 ml	Percentagem do colesterol esterificado em relação ao total	Percentagem do colesterol livre em relação ao total
24 SET	1	BLOOR	287	218	—	76 %	24 %
24 SET	1	KLUNG.	290	—	70	76 %	24 %
24 SET	3	BLOOR	280	213	—	76 %	24 %
24 SET	3	KLUNG.	290	—	70	76 %	24 %
30 SET	—	BLOOR	212	161	—	76 %	24 %
30 SET	—	KLUNG.	215	—	60	72 %	28 %
10 OUT	2	BLOOR	167	124	—	74 %	26 %
10 OUT	2	KLUNG.	175	—	40	77 %	23 %
10 OUT	4	BLOOR	172	134	—	78 %	22 %
10 OUT	4	KLUNG.	168	—	44	74 %	26 %
10 OUT	8	BLOOR	254	193	—	76 %	24 %
10 OUT	8	KLUNG.	250	—	70	72 %	28 %

Em face das determinações efectuadas, verificamos uma analogia de valores, contudo, reparamos numa ligeira elevação dos ésteres pelo método de BLOOR em relação àqueles calculados segundo KLUNGSÖYR.

Não foram efectuadas determinações com o método do doseamento do colesterol livre integrado na técnica do colesterol total de PEARSON.

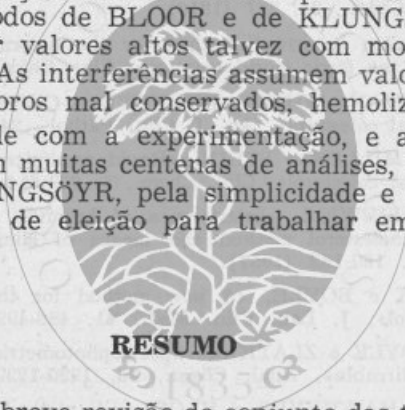
III — CONCLUSÕES

O método clássico de BLOOR mostrou-se muito regular nas suas detreminações, quase sempre concordantes com as de KLUNGSÖYR, todavia, possui uma técnica morosa que apresenta várias dificuldades de execução e, ainda, uma reacção de coloração pouco estável.

O método do cloreto férrico de KLUNGSÖYR, de execução rápida e técnica simples, exhibe uma reacção de coloração de grande sensibilidade e estabilidade.

O método de PEARSON, considerado por muitos autores como o melhor método directo, é possuidor duma técnica muito rápida; contudo, as determinações obtidas oscilam positiva e negativamente em relação aos métodos de BLOOR e de KLUNGSÖYR, revelando tendência para obter valores altos talvez com motivo na ausência de desproteinização. As interferências assumem valores excepcionais, especialmente, em soros mal conservados, hemolizados e ictéricos.

Em conformidade com a experimentação, e após cuidadosa e atenta observação em muitas centenas de análises, o método do cloreto férrico de KLUNGSÖYR, pela simplicidade e rigor de técnica, considera-se como o de eleição para trabalhar em grandes séries.



RESUMO

O autor faz uma breve revisão de conjunto das técnicas de determinação do colesterol total, esterificado e livre, em soros sanguíneos e realiza uma primeira selecção de métodos, apresentando as razões que o levaram a experimentar as técnicas de BLOOR, de KLUNGSÖYR e de PEARSON.

Após ensaios experimentais, encontra vantagens no método do cloreto férrico de KLUNGSÖYR em relação ao clássico de BLOOR, de técnica mais difícil e demorada e, ainda, em relação ao processo directo de PEARSON, menos regular nas suas determinações.

Conclui elegendo o método de KLUNGSÖYR para uso em análises de aplicação à clínica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GRADWOHL'S LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS, 1970.
- [2] Idem, edição 1963.
- [3] FUNDAMENTALS OF CLINICAL CHEMISTRY, TIETZ, 1970.
- [4] CHIMIE CLINIQUE, THEORIQUE, ET PRATIQUE, RICHTERIC, 1967.

- [5] COLESTERINA TOTAL E LIVRE, BENNI ZAK, «Métodos seleccionados de análise clínica», Vol. V, 1969.
- [6] QUÍMICA CLÍNICA, BASE Y PRINCIPIOS, RICHARD Y HENRY, 1969.
- [7] MANUAL DE ANALISES CLÍNICAS, RAFAEL JOSÉ MORA LARA, 1965.
- [8] ANALISES CLÍNICAS, DAVIDSON e WELLS.
- [9] ANALISES CLÍNICAS, SAMUEL, 1969.
- [10] MANUAL PRÁTICO DE ANALISES CLÍNICAS, OPAL e HEPLER, 1967.
- [11] ALLEN, BARKER HINES, Peripheral Vascular Diseases, 1964.
- [12] SHEILE SHERLEK, Diseases of liver, 1968.
- [13] COOK R. P., Cholesterol, Academic Press N. Y., 1958.
- [14] MICHAELS GD, WHEELER Col., Ann. N. Y. Acad. Sci., 73, 633, 1959.
- [15] ZAK, B., Am J. Clin. Pathol., 27, 583, 1957.
- [16] BLOOR, Biol. Chem., 24, 227 (1916).
- [17] CRAWFORD, «Am improved method for the determination of free and total colesterol using the ferric clorid reaction», Clin. Chim. Acta, 3, 357, 367, 1958.
- [18] ZAK, DICKENMAN: WHITE: BURNETT e CHERNEY, «Rapid estimation of free and total colesterol», An. J. Clin. Pathol., 24, 1307-1315, 1954.
- [19] COURCHANS, MILLER e STEIN, «Rapid semimicro procedure for estimation of free and total colesterol», Clin. Chem., 5, 609-614 (1959).
- [20] RICE e LUKASIEWICZ, «Interference of bromide in the zak ferric chloride-sulfuric acid colesterol method and means of eliminating this interference», Clin. Chem., 3, 160-162 (1957).
- [21] ZLATKIS, ZAK e BOYLE, «A new method for the direct determination of serum colesterol», J. Lab. Clin. Med., 41, 486-492 (1953).
- [22] ZAK MOSS BOYLE e ZLATKIS, «Spectrophotometric study of some oxidative products of bilirubin», Anal. Chem., 26, 1220-1222 (1954).
- [23] KLUNGSÖYR, HAWKENES e KLOSS, «A method for the determination of colesterol in blood serum», Clin. Chim. Acta, 3, 514-518 (1958).
- [24] PEARSON, STERN e McGAVACK, Analyst Chem., 25, 813 (1953).
- [25] WATSON, Clin. Chim. Acta, 5, 637 (1960).
- [26] JONES e MORELAND, Clin. Chem., 1, 345 (1955).
- [27] SCHOENHEIMER BEHRING, HUMMEL, Physiol. Chem., 192, 93 (1930).
- [28] FIESER, J. Amer. Chem. Soc., 73, 5007 (1951).
- [29] CARR e DREKTER, Clin. Chem., 2, 353 (1956).
- [30] BLOOR, PELKAN e ALLEN, Biol. Chem., 52, 191 (1922).
- [31] SEARCY R. L. BERGQUIST, An. J. Med. Technol., 25, 237 (1959).
- [32] LEFFLER H. H., An. J. Clin. Phatol., 31, 310 (1959).
- [33] SCHOENHEIMER, Hoppe-Seylers 2 Physiol. Chem., 215, 59 (1933).
- [34] BOHN y BICKENBACH, 2. Exp. Med., 71, 566 (1930).
- [35] MORRIS TG, J. Clin. Pathol., 12, 518 (1959).
- [36] MOORE y BOYLE, Clin. Chim. Acta, 9, 156-162 (1963).
- [37] QUESTIONS and ANSWERS, J. Am. Med., Anoc, 166, 310 (1958).
- [38] KEYS A ANDERSON e Col, Clin. Chem., 1, 34 (1955).
- [39] PFLEIDERER e Col., Klin. Wochsch., 37, 39 (1959).

- [40] THOMAS, EISENBERG e Col., *Am. Internac. Med.*, **54**, 413 (1961).
- [41] OKEY y BOYDEN, J. *Biol. Chem.*, **72**, 261 (1927).
- [42] ETIENNE y POLONOVSKY, J. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **61**, 805 (1959).
- [43] Referências dos Reagentes «Dr. HEINZ HAURY».
- [44] Referências de «TEST MEMO» de «BOEHRINGER MANNHEIM GMBH».
- [45] Manual of Clinical Methods for «COLEMAN JUNIOR SPECTROPHOTOMETER».
- [46] MORGADO A. I. R., «Determinação do colesterol, nota comparativa sobre os métodos do cloreto férrico e do BLOOR», *Revista Portuguesa de Farmácia*, **XIII**, 4 (1963).
- [47] VASCONCELOS M. H., «Trabalho não publicado».
- [48] PALLA GARCIA C., «Conclusões de trabalhos experimentais não publicados».



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

REVISÕES DE CONJUNTO

ENZIMAS E ACÇÃO ENZIMÁTICA (*)

JOSÉ GABRIEL R. DA SILVA GOMES

Aluno do 2.º Ano da Faculdade de Farmácia de Lisboa

1. Para a realização das reacções metabólicas inerentes à vida, a célula necessita do concurso de catalisadores poderosos, os *biocatalisadores*, a que inicialmente se deu o nome de *diastases*, e que actualmente se denominam enzimas.

As primeiras tentativas de estudo dos processos enzimáticos deveram-se a RÉAUMUR (1713), e versaram sobre a digestão da carne «in vivo» e «in vitro» pela acção do suco gástrico do bútio.

Estas experiências foram retomadas mais tarde por SPALLANZANI (1783) que utilizou como biocatalisador o suco gástrico da gralha, tendo obtido resultados idênticos aos de RÉAUMUR.

Estas primeiras iniciativas, se não conseguiram estabelecer os princípios básicos da actividade catalítica dos fermentos naturais, conseguiram no entanto mostrar que era viável a efectivação do processo bioquímico da digestão, na ausência de um meio celular vivo.

Quando KIRCHOFF demonstrou experimentalmente que um extracto de malte tinha as mesmas propriedades sacarificantes que o malte propriamente dito, iniciou-se um movimento científico que levou ao isolamento e identificação de uma série de princípios activos, aos quais se aplicou igualmente a denominação de diastases.

Exemplos da acção desenvolvida neste sentido são a descoberta da pepsina do suco gástrico por SCHWANN em 1836, a descoberta da tripsina do suco pancreático por KÜHN em 1848 e ainda a descoberta da lipase gástrica por CLAUDE BERNARD em 1849.

PASTEUR, na peugada destes investigadores, dedicou a sua atenção a este estudo, e formulou a hipótese da existência de dois tipos de enzimas:

— *fermentos figurados*, que necessitavam para a sua actividade da integridade da célula viva;

— *fermentos solúveis*, que considerava como simples moléculas extraídas de um ser vivo.

(*) Trabalho elaborado como preparação para a Prova Oral do Exame Final da Cadeira de Botânica Geral na Faculdade de Ciências de Lisboa (Julho de 1971).

Os trabalhos posteriores de BÜCHNER levaram a rejeitar os conceitos de PASTEUR, com o que estes perderam a importância que inicialmente se lhes havia atribuído.

Submetendo a levedura de cerveja a elevadas pressões, BÜCHNER extraía dela um suco que denominou *zimase*, e apresentava as mesmas propriedades enzimáticas que haviam sido verificadas na levedura de cerveja antes do tratamento a que foi submetida.

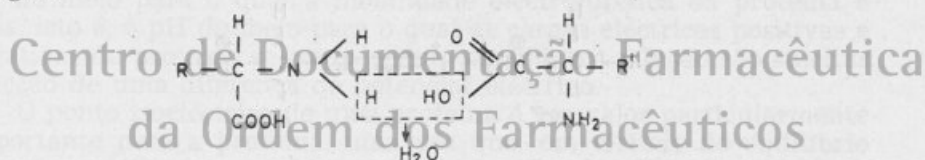
Dos trabalhos de BÜCHNER foi-se levado a concluir que os fermentos figurados de PASTEUR, actuavam apenas por intermédio dos correlativos fermentos solúveis, ou seja por intermédio dos enzimas que eles geram e encerram.

Ao longo do Século XX, têm-se multiplicado os trabalhos sobre a actividade enzimática, quer com o objectivo de conhecer a estrutura dos enzimas, quer com o objectivo de conhecer o mecanismo da sua acção, e os nomes de alguns dos cientistas que têm dado a este campo da Ciência maior contribuição, entraram, a bem dizer, no domínio do conhecimento geral.

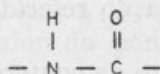
Como resultado de toda uma complexa actividade científica orientada no sentido de permitir estabelecer os princípios que regulam a actividade enzimática, a estrutura química e a composição dos enzimas, procurou-se definir o que como tal se deveria entender, convencionando-se que se deve considerar como enzima todo o catalisador de natureza proteica, termolábil, e produzido por um organismo vivo.

2. Sob o ponto de vista químico as proteínas são macromoléculas formadas por uma cadeia mais ou menos longa de amino-ácidos, dispostos na molécula por ordem variada.

A ligação dos amino-ácidos na molécula proteica faz-se sempre, qualquer que seja a proteína considerada, por conjugação entre o grupo carboxilo da molécula de um dos amino-ácidos e o grupo aminogénio da molécula seguinte, com eliminação de uma molécula de água:



A este tipo de ligação, que se pode representar estruturalmente por



dá-se o nome de ligação peptídica.

Os amino-ácidos, elementos estruturais das proteínas, são assim compostos de função mista, que possuem na sua estrutura, simultaneamente, a função carboxilo $-\text{COOH}$ e a função amina $-\text{NH}_2$.

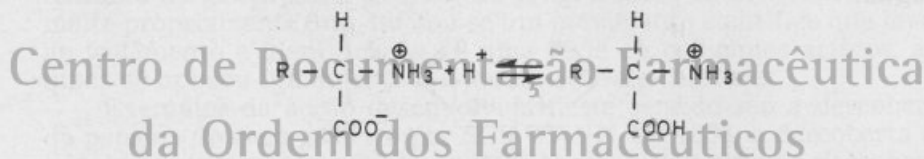
Os ácidos constituintes podem ser de cadeia carbonada longa, distinguindo-se entre eles, e consoante o número de átomos de carbono que separam as duas funções indicadas, os amino-ácidos α , quando não apresentam átomos de carbono entre as referidas funções, os amino-ácidos β , quando apresentam um átomo de carbono entre as duas funções, e assim sucessivamente teremos amino-ácidos γ , δ , etc.

É de notar que os amino-ácidos naturais, cerca de 20, que entram na composição das proteínas, pertencem todos à série dos amino-ácidos α .

Exceptuando o caso da glicocola ou ácido amino-acético todos os outros amino-ácidos são substâncias ópticamente activas, isto é, substâncias que determinam a rotação do plano de polarisação da luz. No caso dos amino-ácidos esta acção deve-se à presença na molécula do composto de um ou mais átomos de carbono assimétrico, que é como quem diz, de átomos de carbono que apresentam as quatro valências, resultantes da hibridação dos orbitais $2s^2$ e $2p^2$, saturadas por átomos ou radicais todos diferentes.

Notaremos em todo o caso que a actividade óptica de uma substância pode ser devida a factores independentes da existência ou não existência de átomos de carbono assimétrico na sua estrutura, como é nomeadamente o caso do quartzo (bióxido de silício), cuja acção sobre o plano de polarisação da luz se admite encontrar-se na dependência de uma assimetria intramolecular dos átomos que constituem a sua molécula.

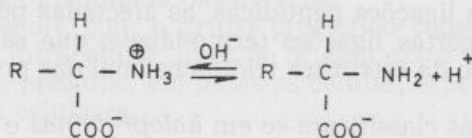
A presença dos grupos carboxílico e amínico na molécula de um amino-ácido, faz com que, de acordo com a Teoria de BRÖNSTED, este se comporte como um ião misto ou zwitterião, de acordo com o esquema



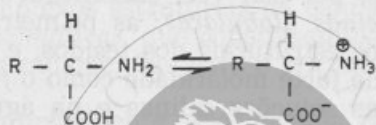
De acordo com BRÖNSTED, é o radical $-\text{NH}_2$ (básico) carregado positivamente após a combinação com o ião H^+ liberto pelo radical carboxilo, que vai comportar-se como ácido, enquanto que o radical $-\text{COOH}$ (ácido), por cedência do referido ião H^+ , se vai comportar como base.

Os amino-ácidos, pelo facto de conterem simultaneamente na sua molécula um grupo ácido e um grupo básico, comportam-se em solução, e na dependência do valor do pH do meio, umas vezes como ácidos e outras como bases, isto é, umas vezes como dadores de prótons e outras como acceptores de prótons, de acordo com a Teoria de BRÖNSTED o que lhes confere características de anfóteros.

Concretizando teremos que, em meio alcalino, um amino-ácido se comporta de acordo com



ou seja como dador de protões, enquanto que em meio ácido, se comporta de acordo com



ou seja como acceptor de protões.

Estas acções põem em evidência o carácter anfotérico dos amino-ácidos, mostrando que de facto, e como tínhamos afirmado, se comportam como ácidos em meio alcalino, e como bases em meio ácido.

O facto de as proteínas serem formadas pela união peptídica de um grande número de amino-ácidos, encadeados de formas as mais variadas, implica que as proteínas possuam do mesmo modo um carácter anfotérico, ou seja que, à semelhança dos seus constituintes, se comportem como ácidos em meio alcalino e como bases em meio ácido, e que na sequência deste facto apresentem a sua actividade óptima para um meio de pH bem determinado.

Entende-se como *ponto isoelectrico* de uma proteína o valor do pH do meio para o qual a mobilidade electroforética da proteína é nula, isto é, o pH do meio para o qual as cargas eléctricas positivas e negativas da proteína se compensam, quando, em solução são sujeitas à acção de uma diferença de potencial eléctrico.

O ponto isoelectrico de uma proteína é um valor particularmente importante para a proteína, uma vez que, em virtude do equilíbrio eléctrico verificado em solução para esse valor de pH, as proteínas se inactivam, precipitando até expontâneamente em certos casos, como sucede com a insulina. Por outro lado, e em relação com o meio celular, resulta destes factos que, para que a actividade metabólica da célula subsista, é necessário que o pH fisiológico se mantenha constantemente diferente do valor do ponto isoelectrico das proteínas em presença.

Como consequência das suas propriedades anfotéricas as proteínas são utilizadas pela célula como reguladores do efeito-tampão do meio celular, neutralizando os excessos de ácidos ou de bases resultantes do metabolismo da célula.

O comportamento das proteínas é ainda influenciado pela temperatura do meio em que se encontram, tendo sido verificado que,

quando submetidas a temperaturas superiores a 60° C sofrem uma desnaturação, não libertando moléculas de amino-ácidos.

Aceita-se que, nestas condições, não são as ligações covalentes que constituem as ligações peptídicas, as afectadas pelo processo térmico, mas antes certas ligações termo-lábeis, que são fundamentais para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas.

3. As proteínas classificam-se em *holoproteínas* e *heteroproteínas* consoante da sua *hidrólise* (reacção reversível de dupla decomposição em que um dos reagentes é a água) se obtêm apenas amino-ácidos, ou se obtêm também compostos de natureza não proteica, denominados *grupo prostético* das proteínas.

As holoproteínas, por sua vez, classificam-se em *holoproteínas fibrilares* e *holoproteínas globulares*; as primeiras entram na composição dos complexos estruturais dos tecidos, e podem ser solúveis nas soluções salinas de forte molaridade como o *fibrinogénio do plasma*, ou insolúveis nas soluções salinas e na água, denominando-se então *escleroproteínas*, de que são exemplo as *queratinas* que formam as unhas, as calosidades e a matéria córnea.

As *holoproteínas globulares*, muito mais importantes, podem classificar-se por sua vez, de acordo com o seu peso molecular, e ordem crescente de complexidade, em:

— *protaminas*, muito básicas, não contendo nem amino-ácidos sulfurados, nem amino-ácidos aromáticos;

— *histonas*, básicas, contendo amino-ácidos sulfurados e tirosina;

— *prolaminas*, ricas em prolina e glutelinas;

— *albuminas*, caracterizadas por um peso molecular muito elevado e um ponto isoelectrico a pH baixo, por efeito do seu carácter ácido, tendo como exemplos a lacto-albumina do leite, a soro-albumina do sangue e a ovo-albumina da clara de ovo;

— *globulinas*, de peso molecular muito elevado, precipitando em solução neutra pelos solutos semi-saturados de sulfato de amónio, menos ácidas que as albuminas, e tendo como exemplo as globulinas do soro sanguíneo, a ovo-globulina e a lácteo-globulina, apresentando além do mais a propriedade comum de coagularem pelo calor.

As *heteroproteínas* são por sua vez susceptíveis de serem classificadas em tipos, na dependência dos grupos prostéticos que contêm:

— *núcleoproteínas*, com o grupo prostético constituído por ácidos nucleicos;

— *cromoproteínas*, com o grupo prostético contendo metais diversos, que por vezes lhes conferem cores características como é o caso da *hemoglobina* ou dos *citocromos*;

— *fosfoproteínas*, com o grupo prostético constituído por agrupamentos moleculares contendo fósforo, como é o caso da *caseína do leite*, ou da *vitelina do ovo*;

— *glucoproteínas*, mal definidas, mas contendo como grupo prostético substâncias glucídicas, de que são exemplos a *ovo-mucóide* da clara do ovo e as globulinas plasmáticas;

— *lipoproteínas*, com o grupo prostético constituído por lípidos quer de origem intracelular, quer de origem extra-celular, e que existem, segundo se presume, em todas as células, especialmente ao nível das membranas celulares.

Tomando como critério de classificação o papel desempenhado na célula pelas proteínas, podemos classificá-las em:

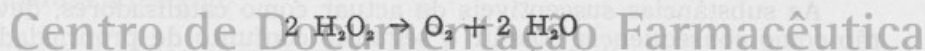
— *proteínas estruturais* que, tal como o nome indica, entram na composição dos complexos estruturais da célula;

— *proteínas enzimáticas*, que constituem os complexos enzimáticos da célula e são fundamentais para o seu metabolismo.

Os *enzimas*, quimicamente relacionados com as proteínas, são formados por uma parte proteica, sempre presente, a que se dá o nome de *apoenzima*, e outra, que pode existir ou não, de natureza não proteica quando existe, a que se dá o nome de *coenzima*, e corresponde ao grupo prostético das heteroproteínas.

Ao *enzima total*, conjunto do apoenzima e do coenzima, deu-se o nome de *holoenzima*, sem prejuízo da existência de enzimas em que não coexistam, como dissemos, a fracção proteica e a fracção prostética (enzimas sem coenzima).

Citaremos como exemplo dos *holoenzimas* os *citocromos*, com estrutura semelhante à da hemoglobina e propriedades gerais compreendidas entre as dos enzimas e as dos pigmentos respiratórios; as *catalazes*, que promovem a decomposição do peróxido de hidrogénio formado nas células no decorrer das respectivas reacções de oxidação, actuando de acordo com o esquema.



e ainda as *peroxidases*, que catalizam as reacções de oxidação, não a partir do oxigénio molecular, mas a partir dos peróxidos ao seu dispor.

São exemplos de *enzimas sem coenzima*, a *ribonuclease* que é o enzima de mais baixo peso molecular que se conhece, a *urease* e a *tripsina*, nas moléculas das quais não é possível distinguir uma parte exclusivamente proteica de outra não proteica.

4. A data a partir da qual são conhecidos os processos catalíticos perde-se no longe dos tempos, mas sabe-se, por exemplo, que a fabricação do sabão por hidrólise de gorduras animais catalisada pelos alcalís das leixívas de cinzas, é conhecida há cerca de 2500 anos.

Deve-se no entanto a BERZÉLIUS (1836) o mérito de sistematizar os primeiros conhecimentos científicos relacionados com os processos catalíticos, tendo sido ainda ele que denominou de *catálise* os fenómenos de variação da velocidade de uma reacção por acção de subs-

tâncias que, embora não se consumindo durante ela, são capazes de alterar positiva ou negativamente a velocidade do fenómeno.

As substâncias com esta capacidade de acção são denominadas *catalisadores*, e são substâncias que, intervindo na reacção química, modificam a sua velocidade sem serem consumidas no decurso do fenómeno, e se comportam por este motivo como se fossem simultaneamente *reagentes e produtos da reacção*.

A velocidade de cada reacção a uma temperatura determinada depende essencialmente de dois factores:

- a energia de activação dos reagentes presentes, e
- a orientação recíproca das partículas reagentes no momento do choque.

Um *catalisador*, para poder exercer a sua acção, deve portanto afectar um destes factores, ou afectar simultaneamente os dois, para que da sua acção possa resultar a pretendida modificação da velocidade do fenómeno.

Quando a acção do catalisador se exerce sobre a energia de activação dos reagentes, admite-se que o seu papel é o de substituir o processo único, ou o mais lento, de uma dada reacção, por outros mais rápidos, aceitando-se então que o catalisador vai, pela sua acção, formar um composto intermediário por um processo que exige menor energia de activação. O composto intermediário formado continuará então um ciclo de reacções no qual se regenera o enzima e se formam os produtos que naturalmente se obteriam se a reacção não fosse catalisada.

Quando o catalisador actua sobre a orientação das moléculas no momento do choque, admite-se que o seu papel é o de as adsorver à sua superfície, de modo a que de aí resultem situações correspondentes a uma maior probabilidade de que se produza a reacção.

As substâncias susceptíveis de actuar como catalisadores, deverão como consequência possuir o seguinte conjunto de propriedades específicas:

- permanecerem quimicamente inalteradas no final da reacção;
- actuarem em pequenas quantidades, de modo a que uma quantidade mínima possa catalisar a transformação de grandes quantidades dos reagentes;
- não alterar a posição de equilíbrio, se a reacção for reversível.

Os fenómenos químicos em que intervem a acção de um catalisador — reacções catalíticas ou catalisadas — podem classificar-se consoante a natureza dos componentes do sistema, em fenómenos de:

- *catálise homogénea*, se os reagentes e o catalisador pertencem à mesma fase;
- *catálise heterogénea*, se os reagentes e o catalisador pertencem a fases distintas.

A catálise homogénea pode ocorrer em fase gasosa, ou em fase líquida, por serem estas as únicas formas possíveis para um sistema monofásico.

Quanto à catálise heterogénea, podemos dizer que os casos mais frequentes verificados para este tipo de catálise são os dos sistemas reaccionais gasosos ou líquidos, que se processam na presença de um catalisador sólido.

A este tipo de catálise também se dá o nome de catálise de contacto, e é o tipo de catálise característico das reacções biológicas de natureza enzimática, em que as pequenas partículas coloidais dos enzimas actuam como catalisadores heterogéneos.

A acção de um catalisador sólido depende da extensão da superfície de contacto entre o catalisador e os reagentes, pelo que esta deve ser o maior possível; nestas condições o catalisador exerce, como facilmente se depreende, uma actividade muito maior, pelo que a sua acção será maximizada.

É por esta razão que os catalisadores metálicos, como o níquel, a platina e outros, se utilizam sempre numa forma muito dividida, sobre suporte poroso, para que a superfície de contacto com os reagentes seja fortemente acrescida.

Um catalisador heterogéneo actua sobre a velocidade de uma reacção manifestando simultaneamente a sua acção das três formas seguintes:

— adsorvendo as moléculas reagentes à sua superfície, e mantendo-as com configurações geométricas espaciais favoráveis para que se produza a reacção;

— armazenando à superfície parte do calor libertado na reacção de algumas moléculas reagentes, para o utilizar na activação de novas moléculas;

— reduzindo o valor da energia de activação necessária para que se produza a reacção.

Para explicar esta acção do catalisador, admite-se que, ao adsorver à superfície as moléculas reagentes, se formam ligações muito fortes entre os átomos da molécula do catalisador e os átomos das moléculas dos reagentes, as quais, diminuindo as forças intramoleculares das moléculas dos reagentes, fazem diminuir simultaneamente o valor da energia necessária para que se produza a rotura destas ligações, com o que se diminue ao mesmo tempo o valor da energia de activação necessária para que a reacção se produza, ou inicie.

5. Ao nível celular produzem-se reacções que, nas mesmas condições de pressão, de temperatura e de pH, não seriam possíveis em meio laboratorial.

O facto de tais reacções se processarem no meio celular, em condições amenas quer dos valores da temperatura, quer dos valores da pressão, quer mesmo dos valores do pH do meio, é devido à presença na célula de certos catalisadores muito activos, de tipo especial, e que já referimos — os biocatalisadores — denominados enzimas, os quais

actuaem enèrgicamente sobre as reacções que se processam na célula viva de forma a aumentar-lhe prodigiosamente a sua velocidade.

O conjunto de substâncias cuja transformação é catalisada pelos enzimas denomina-se substracto, e verificou-se que a velocidade de uma reacção enzimática é simultâneamente função da concentração do substracto e da concentração do enzima.

Se, num sistema de eixos coordenados, representarmos em ordenadas a velocidade da reacção (V) e em abcissas a concentração do substracto ($[S]$), a função $V = f[S]$, será representada por uma curva como a da fig. 1,

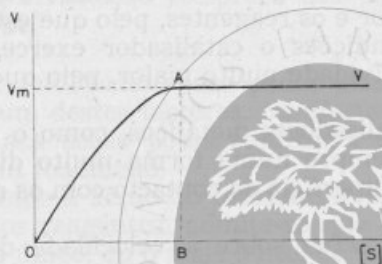


Fig. 1

em que o ramo ascendente traduz a proporcionalidade que inicialmente se verifica entre os valores da velocidade de reacção, e os valores da concentração do substracto.

Com o aumento dos valores da concentração do substracto, a curva sofre uma inflexão, para se tornar paralela ao eixo das abcissas: a velocidade de reacção atinge um valor máximo (V_m), que corresponde à saturação de todo o enzima em presença do substracto, e é traduzido gráficamente pela parte da curva em patamar.

Se, por outro lado, considerarmos a variação da velocidade da reacção (V), em função da concentração do enzima ($[E]$), e representarmos gráficamente a função $V = f[E]$, tomando, num sistema de coordenadas cartesianas, V em ordenadas e $[E]$ em abcissas, obteremos uma curva do tipo representado na fig. 2,

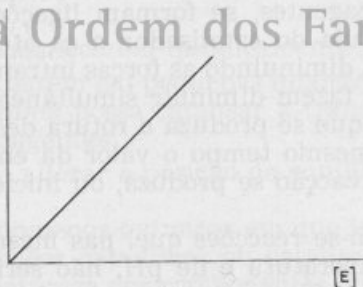


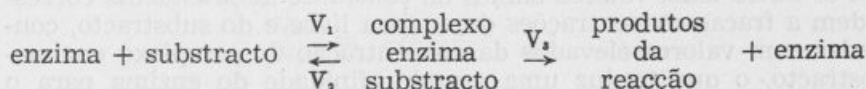
Fig. 2

que traduz a proporcionalidade entre estas duas grandezas, ou seja que, a velocidade de uma reacção enzimática é proporcional à concentração do enzima, desde que a concentração do substracto se mantenha constante.

De acordo com MICHÄELLIS, cada enzima em presença de um substracto conveniente, dá origem à formação de um composto intermediário — o complexo enzima-substracto — que se decompõe segundo dois processos, dos quais um origina os produtos da reacção

e regenera o enzima utilizado, e o outro mantém o equilíbrio entre as quantidades do enzima e do substracto não transformados.

O fenómeno pode, de uma forma global, ser representado pelo seguinte esquema:



Se representarmos por $[E]$ a concentração inicial do enzima, e por $[X]$ a concentração do sistema enzima-substracto ao fim do tempo t , teremos que $[E] - [X]$ será, no mesmo instante, a concentração do enzima livre.

Representando por $[S]$ a concentração do substracto que, utilizado em excesso, se pode, sem erro apreciável, considerar constante ao longo do fenómeno, a aplicação da Lei de Guldberg-Waage à reacção 1 dará

$$V_1 = k_1 ([E] - [X]) \cdot [S]$$

e às equações 2 e 3 dará

$$-V_2 = k_2 [X]$$

e

$$-V_3 = k_3 [X]$$

traduzindo o sinal negativo o facto de as reacções 2 e 3 corresponderem ao desdobraimento do complexo.

Uma vez que seja atingido o equilíbrio, teremos

$$V_1 = V_2 + V_3$$

ou seja $k_1 ([E] - [X]) \cdot [S] = k_2 [X] + k_3 [X]$

de onde

$$\frac{([E] - [X]) \cdot [S]}{[X]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

O valor constante (razão de constantes)

$$\frac{([E] - [X]) \cdot [S]}{[X]} = k_m$$

é denominado «constante de Michäellis».

Vejamos como, da análise dos possíveis valores da *constante de Michäellis*, se podem tirar conclusões relativamente às afinidades relativas de um enzima para um dado substracto.

Se, para um dado sistema, a *constante de Michäellis* apresentar valores elevados, isso significa que a concentração do enzima livre

— $([E] - [X])$ — e a concentração do substracto — $[S]$ — são elevadas em relação à concentração do complexo enzima-substracto — $[X]$ — o que traduz uma fraca afinidade do enzima para o substracto.

Por outro lado, valores baixos da *constante de Michäellis* correspondem a fracas concentrações do enzima livre e do substracto, conjugadas com valores elevados da concentração do complexo enzima-substracto, o que traduz uma grande afinidade do enzima para o substracto.

Definida a *constante de Michäellis* vejamos agora que significado se lhe deve atribuir.

Da expressão anteriormente deduzida

$$k_m = \frac{([E] - [X]) \cdot [S]}{[X]}$$

poderemos tirar, desenvolvendo a expressão

$$k_m = \frac{[E] \cdot [S] - [X] \cdot [S]}{[X]}$$

de onde

$$k_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[X]} - [S]$$

e portanto

$$[X] = \frac{[E] \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

Analiseemos uma vez mais a expressão da reacção enzima-substracto. A velocidade de formação dos produtos da reacção é igual à velocidade de decomposição do complexo enzima-substracto, que os origina, uma vez que tenha sido atingido o equilíbrio, isto é

$$V_s = k_3[X]$$

de onde

$$[X] = V_s/k_3$$

Substituindo este valor na expressão anterior, teremos

$$V_s = \frac{k_3[E] \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

Para a velocidade máxima da reacção, será

$$[X] = [E]$$

e portanto

$$V_m = k_3[E]$$

Dividindo V_m por V_s obtém-se

$$\frac{V_m}{V_s} = \frac{k_m + [S]}{[S]}$$

ou seja

$$\frac{V_m}{V_s} = \frac{k_m}{[S]} + 1$$

Quando for $V_s = V_m/2$, será também

$$2 = \frac{k_m}{[S]} + 1$$

ou seja

$$k_m = [S]$$

isto é, a «*constante de Michäellis*» traduz o valor da concentração do substrato, para o qual a velocidade actual da reacção é igual a metade da sua velocidade máxima.

Representando graficamente a variação dos valores da velocidade de uma reacção enzimática, em função da concentração do

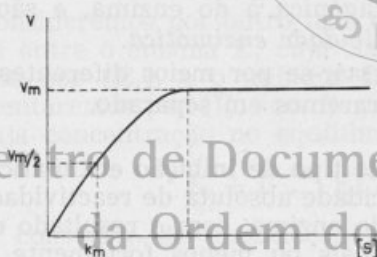


Fig. 3

substrato, obteremos um gráfico como o da fig. 3 (idêntico ao da fig. 1) em que V_m representa a velocidade máxima da reacção.

Tomando no eixo das ordenadas o valor correspondente a metade da velocidade máxima ($V_m/2$) poderemos determinar no eixo das abcissas o valor da concentração do substrato correspondente, que tra-

duz o valor da *constante de Michäellis* para a reacção em estudo.

Retomemos a expressão

$$\frac{V_m}{V_s} = \frac{k_m}{[S]} + 1$$

e demos-lhe a forma

$$\frac{1}{V_s} = \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Na fig. 4 encontra-se a representação gráfica desta equação tomando para ordenadas os valores de $1/V_3$, e para abcissas os valores de $1/[S]$.

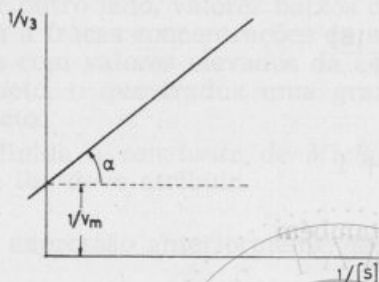


Fig. 4

O exame do gráfico mostra que o coeficiente angular da recta é dado por k_m/V_m , e que $1/V_m$ representa a ordenada da recta na origem.

A partir do valor de V_m fornecido pela representação gráfica da equação de Michællis (fig. 1) e do valor de $\text{tg } \alpha = k_m/V_m$, obtém-se facilmente pelo cálculo o valor da constante k_m

característico da reacção enzimática que se pretenda estudar.

Para obter $\text{tg } \alpha$, podemos simplesmente medir o ângulo α com um transferidor, ou ainda calculá-lo a partir dos valores da ordenada e da abcissa de um ponto qualquer da recta, tendo na devida conta o conhecimento do valor da ordenada na origem.

6. A acção de um enzima sobre um dado substracto é susceptível de ser contrariada pela acção de fenómenos ou agentes que exerçam uma actividade antagónica à do enzima, e são como tal denominados *inibidores da actividade enzimática*.

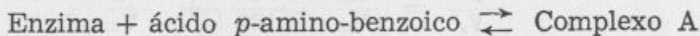
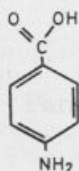
A acção inibidora pode processar-se por meios diferentes, cujas características ou efeitos, consideraremos em separado.

A. Inibição competitiva — Este tipo de inibição enzimática verifica-se quando não existe especificidade absoluta de reactividade química, por parte do *ponto activo* do enzima, com o resultado de este ser susceptível de se combinar mais ou menos fortemente com o inibidor, impedindo assim o acesso do substracto ao enzima; neste caso, e em geral, o inibidor e o substracto apresentam estruturas químicas semelhantes.

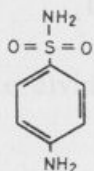
Como exemplo de uma reacção de inibição enzimática deste tipo, podemos citar a acção bacteriostática das sulfonamidas, como seja, por exemplo, a para-amino-benzo-sulfonamida.

Algumas bactérias utilizam o ácido *p*-amino-benzoico como metabolito necessário à formação de um complexo, que designaremos por A, e é indispensável ao seu crescimento.

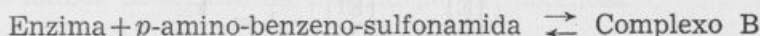
Representemos o fenómeno por



Por outro lado, este mesmo enzima pode conjugar-se com a *p*-amino-benzeno-sulfonamida, para formar um complexo, que designaremos por B, o qual é indiferente para o metabolismo das bactérias.



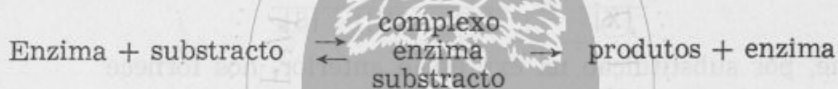
Representemos o fenómeno por



A actividade bacteriológica da sulfamida só se manifesta de maneira eficiente, se a sua afinidade para o enzima for superior à afinidade do ácido *p*-amino-benzoico para o mesmo enzima.

Se assim acontecer irá processar-se uma decomposição do complexo A para originar o enzima livre, o qual por sua vez, e em seguida, se combina com a sulfonamida dando lugar à formação do complexo B.

Retomemos o esquema que serviu de base aos raciocínios de MICHAËLLIS.



e a expressão da constante de equilíbrio — *constante de Michäellis* — definida a partir deste esquema.

$$\frac{([E] - [X]) \cdot [S]}{[X]} = k_m$$

Consideremos por outro lado que se processa uma reacção enzimática entre o enzima E_1 , cuja concentração no equilíbrio representaremos por $[E_1]$, e o inibidor I, cuja concentração no equilíbrio representaremos por $[I]$, com formação do complexo enzima-inibidor EI, cuja concentração no equilíbrio representaremos por $[EI]$.



A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor será dada por

$$k_i = \frac{[E_1] \cdot [I]}{[EI]}$$

de onde

$$[EI] = \frac{[E_1] \cdot [I]}{k_i}$$

Considerando simultaneamente as reacções de formação do complexo enzima-substracto e de formação enzima-inibidor, e atentando em que, no último caso a concentração do enzima livre é dada por

$$[E_{\text{livre}}] = [E] - [EI] - [X]$$

teremos que

$$\frac{[E] - [X]}{[X]} \cdot [S] = \left(\frac{[E]}{[X]} - \frac{[EI]}{[X]} - \frac{[X]}{[X]} \right) \cdot [S]$$

e portanto

$$\frac{[E]}{[X]} - \frac{[EI]}{[X]} - 1 = \frac{k_m}{[S]}$$

de onde se obtém

$$\frac{[E]}{[X]} = \frac{k_m}{[S]} + \frac{[EI]}{[X]} + 1$$

Substituindo nesta expressão [EI] pelo seu valor teremos

$$\frac{[E]}{[X]} = \frac{k_m}{[S]} + \frac{[E_i] \cdot [I]}{k_i \cdot [X]} + 1$$

Da expressão da *constante de Michæellis* poderemos obter

$$\frac{1}{[X]} = \frac{k_m}{([E] - [X]) \cdot [S]}$$

que, por substituição na expressão anterior, nos fornece

$$\frac{[E]}{[X]} = \frac{k_m}{[S]} + \frac{[E_i] \cdot [I]}{k_m \cdot ([E] - [X]) \cdot [S]} + 1$$

Como no equilíbrio é

$$[E_i] = [E] - [X]$$

teremos

$$\frac{[E]}{[X]} = \frac{k_m}{[S]} + \frac{k_m [I]}{k_i [S]} + 1$$

A velocidade máxima de reacção V_m é proporcional a [E], e a velocidade actual V é proporcional a [X] pelo que

$$\frac{[E]}{[X]} = \frac{V_m}{V}$$

ou seja

$$\frac{V_m}{V} = \frac{k_m}{[S]} + \frac{k_m [I]}{k_i [S]} + 1$$

expressão que se pode transformar em

$$\frac{V_m}{V} = \frac{k_i k_m}{k_i [S]} + \frac{k_m [I]}{k_i [S]} + \frac{k_i [S]}{k_i [S]}$$

ou ainda em

$$\frac{V_m}{V} = \frac{k_i k_m + k_m [I] + k_i [S]}{k_i [S]}$$

Resolvendo em ordem a V

$$V = \frac{V_m \cdot [S] \cdot k_i}{k_i k_m + k_m [I] + k_i [S]}$$

e dividindo ambos os termos da fracção por k_i obtém-se

$$V = \frac{V_m [S]}{k_m + \frac{k_m [I]}{k_i} + [S]}$$

ou

$$V = \frac{V_m [S]}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + [S]}$$

que se pode escrever sob a forma linear

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

ou

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \cdot F \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

com

$$F = 1 + \frac{[I]}{k_i}$$

Comparando esta expressão com a da *constante de Michäellis* que transcrevemos sob uma das formas que lhe demos

Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

verificamos que o factor F tem como efeito aumentar o valor do coeficiente angular da recta, com o que aumenta simultaneamente o valor da constante k_m .

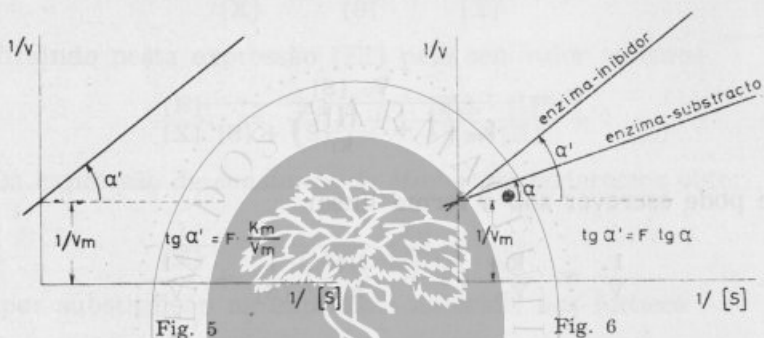
Estas conclusões tornam-se patentes pelo exame das representações das figs. 5 e 6, e do confronto entre elas verificamos que a *actividade do inibidor se traduz por um aumento do valor da constante de Michäellis, o que reflecte, sob o ponto de vista químico, uma diminuição da afinidade do enzima para o substracto.*

B. Inibição não competitiva — Denomina-se inibição não competitiva, qualquer tipo de inibição que não possa ser reversivelmente anulada pelo simples aumento da concentração do substracto presente,

Neste caso, o poder inibidor está na dependência da concentração do agente que provoca a inibição, e da constante de inibição, não sendo influenciado pelo valor da concentração do substracto.

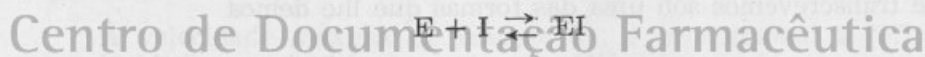
Como exemplo de uma reacção de inibição não competitiva, podemos referir o comportamento da hemoglobina do sangue na presença simultânea do oxigénio e do monóxido de carbono.

Nesta situação, o ponto activo do enzima — o *heme* da hemoglobina do sangue — apresenta maior afinidade para o monóxido de carbono do que para o oxigénio.



Nestas condições, uma elevação da concentração do substracto — oxigénio — não vai influir de qualquer forma na fixação do monóxido de carbono pelo ponto activo da hemoglobina; o monóxido de carbono será totalmente fixado desde que as concentrações da hemoglobina e do monóxido de carbono o permitam, independentemente da concentração do oxigénio presente.

Consideremos a reacção entre o enzima e o inibidor, já anteriormente considerada



para a qual, a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor será

$$k_i = \frac{[E_i] \cdot [I]}{[EI]}$$

ou

$$k_i = \frac{([E] - [EI]) \cdot [I]}{[EI]}$$

por motivos já expostos no decurso de raciocínios anteriores.

Desta expressão obtém-se

$$k_i [EI] = ([E] - [EI]) \cdot [I]$$

ou

$$k_i [EI] = [E] \cdot [I] - [EI] \cdot [I]$$

de onde se pode obter o valor de [EI]

$$[EI] = \frac{[E] \cdot [I]}{k_i + [I]}$$

Como a velocidade de reacção V, na ausência de inibidor é proporcional a [E], e na presença do inibidor (V_i) é proporcional a

$$[E] - [EI]$$

teremos que

$$\frac{V}{V_i} = \frac{[E]}{[E] - [EI]}$$

Substituindo [EI] pelo seu valor, obteremos

$$\frac{V}{V_i} = \frac{[E]}{[E] - \frac{[E] \cdot [I]}{k_i + [I]}}$$

de onde, por simplificação, se obtém

$$\frac{V_i}{V} = \frac{k_i}{k_i + [I]}$$

que nos mostra como a velocidade da reacção enzimática em presença do inibidor, depende da concentração deste e do valor da constante de inibição, mas é independente da concentração do substracto, cujo valor não entra na expressão deduzida.

Dando à expressão anterior a forma

$$\frac{1}{V} = \frac{k_i}{V_i (k_i + [I])}$$

e substituindo na expressão da *constante de Michäellis*, sob a forma já nossa conhecida

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

1/V pelo seu valor agora obtido, teremos

$$\frac{k_i}{V_i (k_i + [I])} = \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

de onde se obtém

$$\frac{1}{V_i} = \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \cdot \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \frac{1}{V_m}$$

ou, pondo $1 + [I]/k_i = F$

$$\frac{1}{V_i} = F \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + F \frac{1}{V_m}$$

Comparando esta expressão, com a expressão correspondente, relativa à inibição competitiva

$$\frac{1}{V} = F \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

verificamos que diferem entre si pelo acréscimo da ordenada na origem, medido pelo valor do factor F .

A fig. 7 traduz a variação de $1/V$ com a de $1/[S]$, no caso da inibição não competitiva, e na fig. 8 sobreposamos as representações gráficas correspondentes aos três casos estudados — reacção sem inibição, reacção com inibição competitiva e reacção com inibição não competitiva — para permitir um confronto rápido sobre o comportamento da reacção enzimática nos três casos referidos.

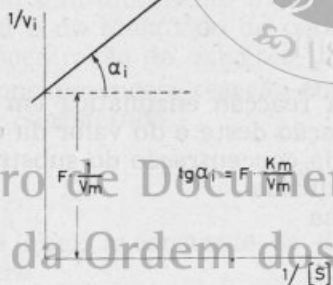


Fig. 7

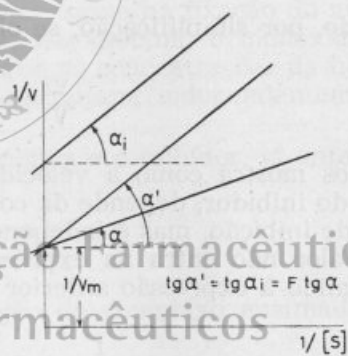


Fig. 8

7. Do exposto ficou-nos a noção de que um enzima é um biocatalizador capaz de produzir a decomposição de um substracto, ou de um pequeno número de substractos, desde que as respectivas estruturas químicas sejam semelhantes.

Inicialmente considerou-se a especificidade enzimática como uma propriedade absoluta, baseando-se os investigadores que defenderam este ponto de vista, no facto, que parecia bem documentado e incontroverso, de se verificar uma acção selectiva da parte de determinados enzimas durante a decomposição de um substracto constituído pela mistura das formas *d* e *l* de uma substância opticamente activa.

De facto, determinados enzimas, segundo foi verificado, catalisam a decomposição de um dos antípodas ópticos de uma mistura racémica, deixando o outro intacto.

Como exemplo documentativo podemos referir o caso do *Pennicillium glaucum* que, colocado na presença do ácido tartárico racémico (mistura equimolecular de ácido tartárico *d* e de ácido tartárico *l*) ataca o ácido tartárico *d*, sem metabolizar o ácido tartárico *l*.

Estudos posteriores levaram ao conhecimento de que um enzima possui de facto especificidade, mas que o facto deve ser considerado sob nova luz: cada enzima pode catalisar a transformação de mais do que um único substracto, desde que se verifiquem em relação, quer ao enzima, quer ao substracto, determinadas condições específicas. Encontram-se neste caso, a título de exemplo, a esterase que promove a decomposição dos ésteres em geral, a peroxidase que promove a decomposição dos peróxidos, e outros que existem em número abundante. Note-se em todo o caso que, quando isto sucede, a velocidade de reacção do enzima relativamente a cada um dos substractos da mistura, não é forçosamente a mesma, e é até, como regra, diferente para cada um dos constituintes do conjunto.

É este o caso, por exemplo da esterase que não actua com igual velocidade sobre todos os ésteres, do mesmo modo que as proteases não exercem a sua acção com a mesma velocidade sobre todas as ligações peptídicas: embora um dado enzima possa atacar simultaneamente diversos substractos, não deixa por isso, nem de manifestar actividade específica, nem, relativamente ao conjunto deixa de manifestar actividade preferencial.

Os enzimas apresentam portanto, e sempre, especificidade, quer em relação à natureza química do substracto, quer, quando susceptíveis de se atacar a diversos substractos, em relação às características individuais de cada um deles: a especificidade dos enzimas continua a ser uma realidade que importa não esquecer, e continua a ser considerada como uma das suas propriedades mais importantes e mais características.

Comportando-se nas acções enzimáticas, como catalisadores específicos, que na realidade são, a sua acção encontra-se na dependência da temperatura do meio, que neste caso assume características particularmente importantes pelo motivo de serem ordinariamente termolábeis, isto é, de serem desnaturados pela acção do calor, com o que perdem a sua actividade enzimática, e isto quer se encontrem no estado puro, quer, como é o caso mais geral, se encontrem em solução.

A temperatura de inactivação de cada enzima, depende, dentro de certos limites, e como seria de esperar, do valor do pH do meio em que se encontrem e do tempo durante o qual se verifique o aquecimento. Se, por exemplo, há casos em que a desnaturação só se verifica a cerca de 80° C, há outros em que a temperatura de 50° C chega perfeitamente para produzir o mesmo efeito, facto que por sua vez se encontra relacionado com a sua composição estrutural.

Caminhando em sentido oposto ao das elevações de temperatura que provocam a desnaturação irreversível dos enzimas, verificou-se que as temperaturas muito baixas provocam a perda total da activi-

dade enzimática, mas neste caso de forma reversível: o regresso a uma temperatura normal (inferior evidentemente à que provocaria a desnaturação), faz com que o enzima retome a sua actividade enzimática habitual.

Representando grãficamente a actividade enzimática de um dado enzima como função da temperatura, obteremos uma curva que apresenta um máximo — fig. 9 — para o valor da actividade enzimática, o qual corresponde a um valor bem determinado da temperatura, que se denomina temperatura óptima da actividade enzimática.

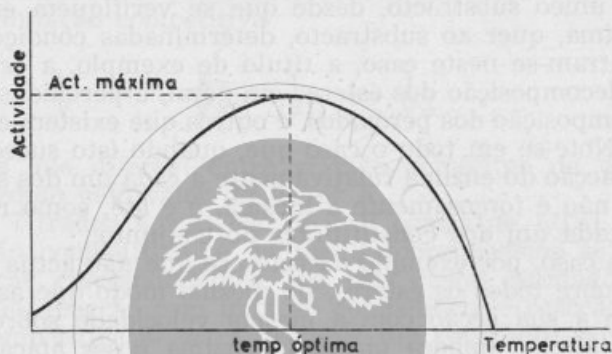


Fig. 9

Quando submetidos à acção de pressões muito elevadas — da ordem de 18 000 atmosferas — os enzimas perdem irreversivelmente a sua actividade catalítica, sucedendo o mesmo quando submetidos à irradiação pelos raios U. V., quando bombardeados com neutrões rápidos, ou ainda quando submetidos à acção de ultrasons de intensidade conveniente, o que tem sido aproveitado para a obtenção de ambientes assépticos pela acção de agentes físicos.

A actividade enzimática varia em função do pH do meio, e a representação gráfica do comportamento do fenómeno mostra a existência de dois valores limites de pH que definem um intervalo fora do qual a actividade enzimática é nula (fig. 10).

Entre estes dois valores do pH do meio, a actividade enzimática apresenta um máximo para um valor de pH perfeitamente definido para cada enzima o qual constitui o *pH óptimo da sua actividade enzimática*.

O valor do pH óptimo para a actividade de um dado enzima pode variar com os seguintes factores:

- natureza do substracto
- origem do enzima
- temperatura do meio
- presença de sais neutros
- concentração do substracto

Os valores de pH que limitam as possibilidades de actividade enzimática de um dado enzima, correspondem aos valores de pK da dissociação das funções ionisáveis dos amino-ácidos implantados no ponto activo do enzima.

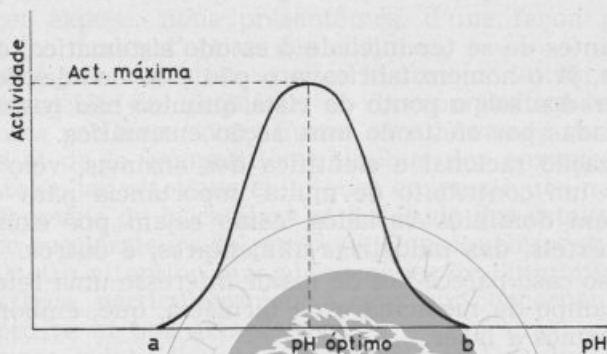


Fig. 10

8. No âmbito celular deparamos com os enzimas e com a sua acção, ao nível citoplásmico, ao nível nuclear, nas mitocôndrias, nos plastos das células vegetais, e ainda nos sistemas citomembranosos.

Os enzimas citoplásmicos actuam sobre uma gama muito vasta de substractos, podendo até a degradação final dos produtos a transformar ser devida à actividade das mitocôndrias.

Ao nível citoplásmico as gorduras são saponificadas, as proteínas decompostas em amino-ácidos e a glucose transformada em ácido pirúvico, no processo da glucólise.

Apesar de tudo, não se sabe muito do que diz respeito ao poder de síntese dos enzimas citoplásmicos.

Ao nível nuclear encontram-se enzimas de tipo diverso pertencentes ao grupo das hidrolases, como as nucleases que catalisam a rotura das ligações de hidrogénio dos nucleotidos, podendo distinguir-se dois tipos de nucleases: as endonucleases, como a ribonuclease e a desoxiribonuclease, e as exonucleases cuja função é diferente.

Ao nível das mitocôndrias encontram-se os enzimas respiratórios como a citocromo-oxidase e a succino-desidrogenase; enzimas que promovem a oxidação dos glúcidos, seguindo um processo cíclico conhecido por ciclo de KREBS, bem como enzimas que determinam a oxidação dos ácidos gordos. De um modo geral é ao nível das mitocôndrias que se realizam, por processos enzimáticos, as oxidações celulares, sendo ainda a esse nível que se realizam certas reacções de síntese proteica, como por exemplo a síntese da glutamina.

Nos plastos das células vegetais encontram-se a clorofilase, nos cloroplastos, e a amilase, as peroxidases, a citocromo-oxidase e diversas desidrogenases nos leucoplastos e nos cromoplastos.

Nos sistemas citomembranosos encontram-se e exercem a sua acção, por exemplo a esterase e a citocromo-redutase, bem como a

dipeptidase, sendo de referir pela sua importância especial, a presença da invertase e da lactase na membrana da levedura de cerveja.

9. Os fenómenos de natureza enzimática foram utilizados pelo homem, na sua actividade quotidiana desde tempos imemoriáveis.

Muito antes de se ter iniciado o estudo sistemático, ou acidental dos enzimas, já o homem fabricava o pão e as bebidas fermentadas, que considerados sob o ponto de vista químico não passam de reacções provocadas por efeito de uma acção enzimática.

A utilização racional e científica dos enzimas, veio no entanto a constituir um contributo de muita importância para o progresso industrial, em domínios variados, como sejam por exemplo o das indústrias têxteis, das indústrias alimentares, e outros.

No nosso caso parece-nos de maior interesse uma referência particular ao campo da medicina e da farmácia, que, embora de forma sucinta passamos a fazer.

O estudo dos enzimas pode fornecer indicações preciosas em análise clínica para o diagnóstico de diversas afecções, como são nomeadamente as que se relacionam com as perturbações digestivas imputáveis a causas patológicas, que podem ser estudadas por análise enzimática, por exemplo dos sucos gástrico e pancreático recolhidos do organismo por meio de sondas para este efeito específico.

Tem sido verificado, por exemplo, que o cancro do estômago faz diminuir, ao ponto de anular, a secreção da pepsina, e, neste caso, parece fora de dúvida que o estudo da acção enzimática será do maior valor.

Parece serem no entanto os enzimas do sangue que se mostram mais sensíveis às modificações patológicas do organismo. Assim, no caso de deficiência de funcionamento do pâncreas, a amilase do sangue, que apresenta actividade constante nos organismos sãos aumenta de forma acentuada.

No domínio da terapêutica encontraram os enzimas um largo campo de acção.

A tripsina emprega-se em cirurgia para a destruição de tecidos mortos, ou como cicatrizante, a trombase emprega-se como coagulante do sangue, etc.

A actividade farmacológica e farmacodinâmica de certos medicamentos deve-se a incidentes que provocam na actividade de certos enzimas do organismo humano.

A indústria farmacêutica sintetiza no laboratório, para fins terapêuticos um grande número de enzimas como são por exemplo, as proteases — a pepsina e a tripsina — que se destinam a superar carências metabólicas de certos organismos, e, se todos os fenómenos da vida são afinal fenómenos com origem em reacções enzimáticas das mais variadas naturezas, não é de repugnar que o progresso no conhecimento de tão complicados fenómenos acabe um dia por reduzir o arsenal terapêutico ao domínio exclusivo dos enzimas como agentes de defesa da saúde humana.

RÉSUMÉ

Dans cet exposé, nous présentâmes, d'une façon générale, la structure et les modes d'action des enzymes.

Commencé par une brève notice historique, suivie d'une étude plus circonstanciée du problème de la composition chimique et structurale des protéines, nous fûmes, ainsi, amenés vers l'étude de la structure et de la composition chimique des enzymes.

A leur tour, les réactions chimiques enzymatiques nous ont conduit au phénomène de la catalyse et à l'étude des catalyseurs considérés comme accélérateurs de réactions. Conséquemment, nous avons porté toute notre attention aux phénomènes de l'inhibition de l'activité enzymatique, particulièrement à ceux qui concernent les inhibitions compétitive et non compétitive.

Finalement, après l'étude des propriétés les plus importantes des enzymes—spécificité, influence de la température, influence des radiations et de la pression, et influence du pH—nous abordâmes la localisation des enzymes au niveau cellulaire et nous terminâmes en indiquant quelques-unes des utilisations pratiques des enzymes nommément dans les domaines de la médecine et de la pharmacie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ATKINSON, Daniel E. et allii — *Kinetics of regulatory enzymes. Kinetic order of the yeast diphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenase reaction and a model for the reaction.* J. biol. Chem., **240**, 2682 (1965).
- [2] AZEVEDO, M. Deodata — *Biocatálise.* Lisboa, Monografias de Química n.º 4, 1961.
- [3] BERNHARD, Sidney — *The structure and function of enzymes.* New York, W. A. Benjamin Inc, 1968.
- [4] BUREAU SCIENTIFIQUE SANDOZ — *Chapitres choisis de Biochimie Générale,* Bâle, Sandoz S. A., s/d.
- [5] BUVAT, Roger — *La cellule végétale.* Paris, Hachette, 1969.
- [6] CHANCE, Britton — *The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase.* J. biol. Chem., **131**, 553 (1943).
- [7] CHAUCHARD, Paul — *La chimie du cerveau,* 6ème ed. Paris, P. U. F., 1960.
- [8] CONN, E. E. and STUMPF, P. K. — *Outlines of biochemistry,* 2nd edn. New York, John Wiley & Sons Inc, 1967.
- [9] COURTOIS, Jean-Émile et PERLÈS, Roland — *Précis de Chimie Biologique,* Tome I, 2ème ed. Paris, Masson & Cie, 1964.
- [10] COURTOIS, Jean-Émile et PERLÈS, Roland — *Précis de Chimie Biologique,* Tome II, 2ème ed. Paris, Masson & Cie, 1965.
- [11] DE ROSNAY, Joel — *Les origines de la vie de l'atome à la cellule.* Paris, Ed. du Seuil, 1970.
- [12] DRATZ, E. A. and CALVIN, M. — *Substrate and inhibitor-induced changes in the optical rotatory dispersion of aspartate transcarbamylase.* Nature, **5048**, 497 (1966).

- [13] FABRE, R. et DILLEMANN, G. — *Histoire de la Pharmacie*. Paris, P. U. F., 1963.
- [14] GUILLIERMOND, A. et MANGENOT, G. — *Biologie végétale*, 2ème ed. Paris, Masson & Cie, 1948.
- [15] HARPER, Harold — *Manual de Química Fisiológica* (Trad. A. Villasana A.). México, El Manual Moderno S. A., 1965.
- [16] INGLES, D. W. and KNOWLES, J. R. — *Specificity and stereospecificity of α -chymotrypsin*. *Biochem. J.*, **104**, 369 (1967).
- [17] KARLSON, Peter — *Biochimie* (Trad. Annie et J. P. Garel). Paris, Ed. Doin, 1964.
- [18] KITTO, G. Barrie et ali — *Enzymatically active conformers of mitochondrial malate dehydrogenase*. *Proc. nat. Acad. Sci. (USA)*, **56**, 578 (1966).
- [19] KNOWLES, J. R. and PARSONS, Carol A. — *Proximity effect in catalysed systems: a dramatic effect on ester hydrolysis*. *Nature*, **221**, 53 (1969).
- [20] KOSHLAND Jr, D. E. — *Conformation changes at the active site during enzyme action*. *Feder. Proc.*, **23**, 719 (1964).
- [21] KOSHLAND, D. E. and NEET, K. E. — *The catalytic and regulatory properties of enzymes*. *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 359 (1968).
- [22] LEAL, Renato da Silva — *Lições de Química Geral ao Curso do 1.º Ano de Farmácia* (1970-71).
- [23] LUMRY, Rufus and EYRING, Henry — *Conformation changes of proteins*. *J. phys. Chem.*, **58**, 110 (1954).
- [24] NEILANDS, J. B. y STUMPF, Paul K. — *Principios de enzimologia* (Trad. C. y J. Villar Palasi). Madrid, Aguilar Ed., 1967.
- [25] NORA, James et ali — *Lactate dehydrogenase isoenzymes in human transplantation*. *Science*, **164**, 1079 (1969).
- [26] PELT, Jean Marie — *Les médicaments*. Paris, Ed. du Seuil, 1969.
- [27] PILET, Paul-Emile — *La cellule. Structure et fonctions*, 3ème ed. Paris, Masson et Cie, 1968.
- [28] POLONOVSKI, Michel — *Biochimie médicale. II Enzymes et métabolismes*, 7ème ed. Paris, Masson & cie, 1965.
- [29] PRETTRE, Marcel — *Catalyse et catalyseurs*, 3ème ed. Paris, P. U. F., 1961.
- [30] RAY Jr, William J. and KOSHLAND Jr, D. E. — *A method for characterizing the type and numbers of groups involved in enzyme action*. *J. biol. Chem.*, **236**, 1973 (1961).
- [31] ROCHA AFONSO, Maria da Luz Tavares Monteiro da — *Lições de Botânica Geral ao Curso do 1.º Ano de Farmácia* (1970-71).
- [32] SCHAPIRA, Georges — *Éléments de Biochimie Générale*, 3ème ed. Paris, Ed. Médicales Flammarion, 1965.
- [33] SOMERO, G. N. and HOCHACHKA, P. W. — *Isoenzymes and short-term temperature in poikilotherms: Activation of lactate dehydrogenase isoenzymes by temperature decreases*. *Nature*, **223**, 194 (1969).
- [34] STOLKOWSKI, Joseph — *Les enzymes*, 4ème ed. Paris, P. U. F., 1968.
- [35] STRASBURGER, E. et ali — *Tratado de Botânica* (Trad. Oriol de Bolós). Madrid, Ed. Marin S. A., 1970.
- [36] WALLWORK, S. C. — *Química Física para estudantes de Medicina, Farmácia y Biología* (Trad. Carlos de Corral). Madrid, Espasa-Calpe S. A., 1963.
- [37] WILSON, G. B. e MORRISON, John H. — *Citologia* (Trad. Moreira Baptista) Lisboa, Fund. Calouste Gulbenkian, 1970.

ÁCIDOS CARBOXITIÓLICOS E OS SEUS ÉSTERES (*)

HIGUINALDO JOSÉ CHAVES DAS NEVES

Assistente eventual da Faculdade de Farmácia de Lisboa

Laboratório de Química Farmacêutica Orgânica

No decorrer dos nossos trabalhos em curso no Laboratório de Química Farmacêutica Orgânica da Faculdade de Farmácia de Lisboa, a nossa atenção foi chamada para o diferente comportamento químico de compostos aparentemente semelhantes. Referimo-nos aos ácidos carboxílicos e seus ésteres quando comparados com os seus análogos sulfurados. Este diferente comportamento químico era, em parte, já esperado mas, dificuldades surgidas em algumas fases do trabalho dirigiram a nossa atenção na busca de informações mais profundas. Por não serem muito abundantes as referências a estes tipos de compostos, geralmente apenas aflorados nos livros de texto, quando não omitidos, pareceu-nos de interesse juntar, numa panorâmica de conjunto, as informações que nos foram proporcionadas pela pesquisa bibliográfica a que nos entregámos.

Numa revisão de conjunto publicada em 1955 por Schoebel e Wagner [65] são abordados, sobretudo, métodos de preparação. É nossa intenção, neste trabalho, generalizar um pouco mais e abordar outros aspectos.

O primeiro facto a chamar-nos a atenção foi a relativa confusão que parece existir na literatura quanto à nomenclatura deste tipo de compostos. Esta confusão parece, aliás, ser generalizada no que se refere aos compostos sulfurados, o que levou Wagner [66] a publicar um trabalho tendente a pôr um pouco de ordem sobre a questão. Assim, sob a designação geral de tioácidos, tanto Hickinbottom [1] como Jenkin e Hartung [2] agrupam três tipos de compostos que designam por tiolácidos, tionácidos, e ditioácidos e aos quais atribuem, respectivamente, as fórmulas gerais I, II e III. Já, porém, Levene e Mikeska [3] atribuem a designação de tioácidos a compostos absolutamente diferentes dos anteriores e que correspondem a uma fórmula geral do tipo IV. Aparecem-nos, ainda sob o nome de tionáci-

(*) Trabalho realizado no âmbito do Grupo de Trabalho subsidiado pelo Instituto da Alta Cultura em funcionamento no Laboratório de Química Farmacêutica Orgânica da Faculdade de Farmácia de Lisboa, dirigido pelo Exmo. Senhor Professor Doutor Lício da Silveira Godinho.

dos, compostos como $H_2S_2O_3$, $H_2S_3O_6$, $H_2S_5O_6$, $H_2S_4O_6$, e $H_2S_6O_6$ [4]. Para este facto chamam a atenção alguns autores [18], pois tionácidos é designação algumas vezes aplicada aos ácidos inorgânicos de fórmula geral $H_2S_xO_6$. Referindo-se a amidas dos tioácidos, Fieser e Fieser [5] indicam compostos do tipo V, mas entendem, por exemplo, como ácido tioglicólico o composto VI, cuja amida, evidentemente, não corresponde à fórmula geral V. Alguns autores [7] referindo reacções coradas para a detecção de tioácidos, indicam reacções de identificação de grupos S-H livres primários, secundários e terciários [8, 9, 10] o que permite concluir que os tioácidos a que tais autores se referem são do tipo IV. Confusões de nomenclatura estabelecem também outros autores [5, 11 e 12] que designam VII como ácido tioacético, VIII como ácido tiobenzóico, mas continuam a chamar a compostos como VI, ácido tioglicólico e que, na realidade, por estes nomes são vulgarmente conhecidos. Também no Index Merck [13] encontramos discrepâncias deste tipo; assim, na referência ao «Di-allate» este é entendido como derivado do ácido tiocarbâmico IX. No entanto, na referência ao «Dissulfiram» entende-se como tiocarbamoil o radical representado por X. Encontram-se referenciados por Heilbron e Bunburry [108] sob o nome de ácido tiobenzóico o composto VIII e sob o nome de ácido tiosalicílico o composto XI. Por Neimysheva e Knunyants [42] são considerados como halogenetos de tioácidos os compostos do tipo XII.

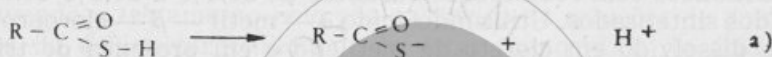
O que fica exposto acima permite demonstrar a incoerência de nomenclatura que se verifica para este grupo de compostos, assim como se tornam evidentes os erros a que tal sistema pode conduzir. Pela nossa parte adoptamos uma nomenclatura uniforme, designando os ácidos correspondendo às fórmulas gerais I, II e III, respectivamente por ácidos carboxitiólicos, ácidos carboltiónicos e ácidos carboditiónicos. A nomenclatura que propomos para estes compostos é idêntica à utilizada para os ácidos carboxílicos: a cadeia carbonada R será designada de acordo com as regras estabelecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, e, ao nome assim obtido, será aposto o sufixo tiólico, tiónico ou ditiónico tal como se exemplifica para VII, XIV e XV, respectivamente designados por ácido etanotiólico, etanotiónico e etanoditiónico.

Nesta nossa revisão vamos ocupar-nos principalmente dos ácidos carboxitiólicos e respectivos ésteres.

I — ÁCIDOS CARBOXITIÓLICOS

Os ácidos carboxitiólicos livres, são, geralmente, corados [1] de odor desagradável e mais fortes que os ácidos carboxílicos correspondentes o que está de acordo com a observação de que, de um modo geral os grupos S—H apresentam maiores valores de K_a que os correspondentes grupos O—H nas mesmas condições. O K_a para o etanol é de cerca de 10^{-17} , enquanto que para o etanotiol o K_a é da ordem das 10^{-11} [14]. O valor de K_a para o ácido acético é de $1,75 \times 10^{-5}$, correspondendo ao ácido etanotiólico um valor de K_a

de $4,69 \times 10^{-4}$. A electronegatividade do enxofre, situando-se entre o carbono e o oxigénio na escala de electronegatividade de Pauling [14] é de cerca de 2,5 enquanto que o oxigénio já apresenta um valor de 3,5. A energia de ligação C—S é de cerca de 75 Kcal/mol a 25°; à ligação S—H corresponde uma energia de 83 Kcal/mol também a 25°, enquanto que a energia da ligação do agrupamento O—H é 110,65 Kcal/mol e ao agrupamento C—O corresponde uma energia de 85,5 Kcal/mol ambas a 25° [15, 16]. Estes valores explicam o poder prever-se e, na realidade verificar-se, serem os ácidos carboxitiólicos mais fortes que os correspondentes ácidos carboxílicos conforme citado, uma vez que podem deixar antever uma mais fácil cedência do protão segundo o equilíbrio



Enquanto que, para os ácidos carboxílicos e para os ácidos carboxitiónicos e respectivos sais as estruturas de ressonância XVIIa e XVIIb para os primeiros e XVIa e XVIb para os segundos, são equivalentes, o mesmo não se verifica para os ácidos carboxitiólicos e respectivos sais cujas fórmulas para os mesómeros e tautómeros não são equivalentes como mostram as estruturas XVIIIa, XVIIIb, XVIIIc, XVIIId, XIXa e XIXb. O equilíbrio está deslocado no sentido da forma tiólica [69, 70, 72]. Encontram-se, pois, os ácidos carboxitiólicos relacionados com os ácidos carboxitiónicos com os quais se encontram em equilíbrio tautomérico sendo a existência livre destes posta em dúvida [2]. São, no entanto, conhecidas as suas amidas de grande interesse em química orgânica.

Os ácidos carboxitiólicos formam ligações de hidrogénio com menor facilidade que os ácidos carboxílicos como pode verificar-se por espectrofotometria de infra-vermelho [71]. Os de baixo peso molecular são líquidos ou sólidos fundindo a baixa temperatura [18]. Os seus sais alcalinos são solúveis na água, sendo insolúveis os sais de metais pesados que se decompõem com facilidade ao ser aquecidos em solução aquosa, originando os respectivos sulfuretos. Este facto levou alguns autores a recomendar em análise o uso de ácido etanotiólico, vulgarmente chamado ácido tioacético, em substituição do ácido sulfídrico na pesquisa de metais pesados. O etanotiolato de chumbo pode ser recristalizado. Segundo Kirk e Othmer não se conhecem ácidos carboxitiólicos de peso molecular elevado [18] embora já tenham sido preparados ácidos carboxitiólicos derivados do ciclohexano e de estrutura esteroide [71].

Podem considerar-se os ácidos carboxitiólicos como anidridos mistos de ácido carboxílico e de ácido sulfídrico e, na realidade, os ácidos carboxitiólicos de peso molecular elevado são facilmente hidrolisáveis mesmo em presença da humidade atmosférica libertando H_2S . Os ácidos carboxitiólicos aromáticos são mais estáveis em solução aquosa, tanto sob a forma de ácido como sob a forma de sal.

Preparação

O método que parece ser o de aceitação mais geral, baseia-se na acilação do gás sulfídrico em presença de um catalisador.

O ácido monocloroetanoiótico pode preparar-se a partir do cloreto de monocloroacetilo no qual se faz actuar o gás sulfídrico durante 8 a 9 horas em presença do tricloreto de alumínio [19]. Esta técnica foi melhorada [68] fazendo-se actuar o gás sulfídrico sobre o cloreto de metileno a -20° durante 2 horas e adicionando à solução assim saturada de gás sulfídrico, cloreto de acilo em presença de tricloreto de alumínio continuando o tratamento pelo gás sulfídrico a uma temperatura de 0° a 15° durante cerca de 20 a 30 horas, até que não se liberte ácido clorídrico. Foram assim obtidos os vários ácidos carboxitiólicos com rendimento variando de 81,6% a 26,6% conforme os ácidos sintetizados. Utilizando ácido α -metil- β -cloropropanotiólico dissolvido em cloreto de metileno e em presença de trietilamina pode obter-se, por esta técnica, num tempo de reacção de 2 horas, 73% de α -metil- β -propiolactona, demonstrando-se que os ácidos carboxitiólicos são intermediários na formação de tiolactonas obtidas a partir dos cloretos de ácidos β -halopropiônicos [68].

Foram preparados ácidos carboxitiólicos com rendimentos que vão de 60% a 65% fazendo reagir gás sulfídrico com cloretos de ácido em piridina anidra [21]. Por esta técnica, o sistema reaccional é exteriormente arrefecido com gelo, submetido a agitação vigorosa, sob fluxo intenso de gás sulfídrico. O gás sulfídrico utilizado na reacção é lavado com solução de iodo e seco com cloreto de calcio anidro. A piridina é previamente saturada com gás sulfídrico e é sobre a piridina já saturada que é lançado, lentamente, durante 2 a 3 horas, o cloreto de ácido, mantendo o sistema à temperatura de 15° no caso de ser utilizado o cloreto de acetilo. Para a preparação do ácido fenilcarboxitiólico os autores [21] preferem uma temperatura da ordem dos 5° . Este método parece ser de aplicação geral [73].

Enquanto o cloreto de acetilo em piridina dá origem ao ácido etanoiótico, por tratamento análogo de uma solução de cloreto de benzoilo em éter de petróleo a -20° obtém-se sulfureto de dibenzoilo [65, 74] o qual, por acção de uma corrente de gás sulfídrico durante 1 hora em solução de piridina e clorofórmio a temperatura ambiente, dá origem a ácido fenilcarboxitiólico [74, 75].

O ácido difeniletanoiótico foi preparado por Tchoubar e Letellier-Dupré, fazendo reagir o cloreto de difenilacetilo com o sulfureto ácido de potássio, com um rendimento de 90%. Outros ácidos carboxitiólicos preparados eram óleos não destiláveis contendo menos de 10% de ácido [22]. O método do cloreto de ácido sobre os sulfuretos ou hidrogenosulfuretos alcalinos é eficiente, sobretudo, na preparação de ácidos carboxitiólicos aromáticos, pois os cloretos de acilo utilizados neste caso, são mais resistentes à decomposição pela água do que os cloretos de ácido alifáticos. Apesar disso, pode ser aplicado na preparação do ácido etanoiótico [76]. Na série aromática o método é utilizável na preparação do ácido fenilcarboxitiólico [76,

79, 83], ácido p-metoxifenilcarboxitiólico [80] e ácido β -naftalenocarboxitiólico [81].

Fazendo reagir os cloretos de ácido alifáticos com sulfureto de sódio, podem obter-se sulfuretos de diacilo com rendimento apreciável e, possivelmente algum polissulfureto [71].

Podem obter-se ácidos carboxitiólicos por reacção dos ácidos carboxílicos com o pentassulfureto de fósforo [82, 78]. Podem ainda fazer-se reagir os anidridos com o gás sulfídrico e uma pequena quantidade de hidróxido de sódio ou, com melhor rendimento, em presença de 1% de piridina a frio [84].

Um outro método indicado por Cronyn e Jiu permite obter, segundo estes autores, os ácidos fenilcarboxitiólico e p-fenilmercaptofenilcarboxitiólico com rendimento de 88%. Trata-se de um método envolvendo o tratamento pelo gás sulfídrico de soluções de anidridos mistos de ácidos carboxílicos e do éster monoetilico do ácido carbónico [85] em cloreto de metileno na presença de quantidade equivalente de trietilamina a -20° com posterior aquecimento à temperatura ambiente [23].

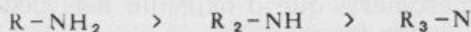
Ainda um outro método de preparação deste tipo de função química será o que a seguir se esquematiza e que se baseia numa reacção de Grignard [86]



a qual permite obter ácidos carboxitiólicos com rendimentos da ordem dos 70% em relação ao teórico.

Propriedades químicas

Os ácidos carboxitiólicos são pouco estáveis em presença da água, sofrendo hidrólise mais ou menos profunda quando em solução [24]. O ácido difeniletanotiólico transforma-se espontaneamente ao ar em $(PhCHCO)_2S$ [22] e, apesar de mais estável do que outros ácidos carboxitiólicos como o ciclohexanocarboxitiólico [71], transforma-se no correspondente ácido carboxílico quando fervido com água durante duas a três horas [22]. São bons agentes de acilação, podendo ser utilizados na acilação das aminas com as quais reagem muito mais facilmente que os ácidos carboxílicos [87], possibilitando condições de reacção mais suaves [23, 88, 89]. Quanto à facilidade de reacção com os ácidos carboxitiólicos podemos dispôr as aminas pela seguinte ordem crescente de reactividade [25, 26, 98, 99]:



o que parece estar relacionado com um certo impedimento estérico. A acilação das aminas pelos ácidos carboxitiólicicos resulta muitas vezes mesmo nos casos em que falham outros métodos



Os ácidos carboxitiólicicos são facilmente oxidados pela acção do iodo e do ferrocianato ou seus sais para dar os correspondentes dissulfuretos [27]. Temos utilizado a acção oxidante do iodo na preparação de dissulfuretos de acilo com bons resultados [71]. O comportamento do ácido fenilcarboxitiólicico e dos seus sais frente aos oxidantes tem sido objecto de vários trabalhos, quer no que se refere à oxidação do próprio ácido pelo ar [86, 90, 91, 92] pelo peróxido de hidrogénio [93, 94], pelo cloreto de enxofre [95] quer dos seus sais pelo ar [94, 96], pelo cloro, [97], iodo, sulfato de cobre, ferricianato de potássio e cloreto férrico. Submetido a uma corrente de ozono, o ácido fenilcarboxitiólicico é rapidamente oxidado [71].

Os ácidos carboxitiólicicos reagem com os alcoóis para dar lugar à formação de esteres dos correspondentes ácidos carboxílicos, formando-se também, algum tiolester na reacção [100, 101]



O ácido etanotiólicico reage explosivamente com o ácido azótico.

Os ácidos carboxitiólicicos adicionam-se às olefinas, diolefinas e derivados acetilénicos [102, 103]. A adição tem lugar no sentido contrário à regra de Markwonikoff sendo, portanto, de admitir um meca-

nismo de radical livre, envolvendo espécies do tipo $R-C \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$.

O que parece ser confirmado pelo observado efeito activante da luz sobre este tipo de adição [29].

Foi estudada polarograficamente a redução de Clemmensen em ácidos carboxitiólicicos e em tiolesteres. O ácido fenilcarboxitiólicico sofre redução de Clemmensen dando um rendimento de 25% em benzilmercaptan, mas o tempo de reacção é muito longo. Em idênticas condições não é possível reduzir o ácido etanotiólicico pelo facto de este ser hidrolizado, dando ácido acético mais estável [31].

A possibilidade de redução de ácidos carboxitiólicicos e dos seus esteres é fundamentada nas seguintes observações [31]:

1 — O enxofre, ao contrário do oxigénio, é capaz de deslocar os electrões π vizinhos.

2 — Quanto à cedência de electrões, o enxofre mostra mais fraca tendência para a mesomeria que o oxigénio mas podendo, em princípio, actuar como dador fraco.

3 — Os grupos carbonilo e tiocarbonilo diferem, principalmente, na sua capacidade de polarização; devido à alta electronegatividade do oxigénio, o grupo carbonilo, fortemente polar, é mais dificilmente polarizável que o grupo tiocarbonilo, menos polar. A ligação 2p-3p que forma a orbital π no grupo tiocarbonilo, sendo mais fraca que a ligação 2p-2p da orbital π do grupo carbonilo, cede mais facilmente à pressão electrónica.

Destas considerações pode concluir-se que um carbonilo dificilmente redutível ou mesmo não redutível, pode ser tornado mais activo e capaz de sofrer redução, pela vizinhança de um átomo de enxofre.

Facto curioso é que, quase todos os ácidos carboxitiólicos que encontramos descritos são ácidos de baixo peso molecular, referindo-se a maior parte dos autores apenas aos ácidos vulgarmente chamados tioacético (etanotiólico) e tiobenzóico (fenilcarboxitiólico) ou seus parentes próximos.

Propriedades espectrais

Os ácidos carboxitiólicos podem considerar-se derivados dos ácidos carboxílicos pela substituição do átomo de oxigénio do grupo O—H carboxílico por um átomo de enxofre. Tal substituição provoca, no espectro do Ultra-violeta, um acentuado efeito batocrómico [71]. O mesmo efeito batocrómico se manifesta no espectro de Infra-vermelho, no que se refere à banda C=O «stretching» a qual, nos ácidos carboxitiólicos estudados, apresenta o seu máximo numa zona que vai dos 1.650 cm^{-1} aos 1.690 cm^{-1} , enquanto que, para os correspondentes ácidos carboxílicos, a mesma banda está compreendida entre os 1.720 cm^{-1} e os 1.700 cm^{-1} [71].

Propriedades terapêuticas

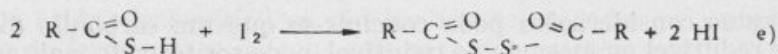
Não encontramos referências à utilização terapêutica ou farmacêutica deste tipo de compostos. Podemos, no entanto, prever uma possível utilização como anti-oxidantes desde que tenham um índice terapêutico adequado e que os inconvenientes do cheiro e sabor desagradáveis sejam suprimidos através de fórmulas galénicas adequadas.

Propriedades analíticas

Um método espectrofotométrico baseado na absorção no Ultra-violeta pela qual é responsável o grupo $\text{C} \begin{matrix} \text{=O} \\ \text{>} \\ \text{S} \end{matrix}$ foi utilizado no estudo cinético da cisão da ligação S-acilo em S-acil- ω -aminomercaptans [32]. Este método parece ser susceptível de aplicação aos ácidos carboxitiólicos, sobretudo no que se refere ao estudo cinético das reacções

envolvendo cisão daquele grupo: hidrólise, acilação de aminas, reacção com os alcoóis, etc.

A titulação iodométrica dos grupos S—H livres [104] é também possível nos ácidos carboxitiólicos mediante aplicação da equação c). Partindo do princípio de que todas as substâncias contendo grupos S—H livres são oxidadas pelo iodo aos respectivos dissulfuretos, Stig estabelece uma técnica iodométrica em meio neutro (in 7).



Baseada no poder redutor do grupo S—H, Werner descreve uma reacção de detecção para este grupo em moléculas orgânicas [34], conforme mostra a equação. Aparece, assim, pela reacção positiva, um precipitado amarelo ou vermelho, devido à precipitação do selénio reduzido.



Todos os compostos tendo um grupo S—H livre dão, com o ácido nitroso, uma reacção corada devida à formação de um nitrosilmercaptido [8, 9, 10]; dissolve-se o composto em etanol ou qualquer outro solvente não aquoso, junta-se nitrato de sódio e acidifica-se com ácido sulfúrico diluído. Com os ácidos carboxitiólicos obtém-se uma coloração verde intensa, pouco estável [71]. Uma modificação desta técnica foi proposta [105], preconizando-se o uso de nitrato de amilo a fim de evitar a formação de vapores rutilantes e dispensar o uso de ácido sulfúrico.

Grote estudou uma reacção corada para a detecção do grupo S—H em cromatografia em papel, descrevendo para este grupo o aparecimento de mancha vermelha após pulverização do cromatograma com o reagente utilizado [36]. Não considera os grupos S—H dos ácidos carboxitiólicos mas verifica-se que estes, nas condições descritas por Grote para os tióis, dão imediatamente uma coloração azul turquesa [71]. O reagente é constituído por uma solução de nitroprussiato de sódio em água (0,5 g/10 ml) a que se adiciona cloridrato de hidroxilamina (0,5 g) e bicarbonato de sódio (1 g). Terminada a libertação de gás adicionam-se duas gotas de bromo cujo excesso é eliminado por uma corrente de ar. Filtra-se e completa-se o volume total com água até vinte mililitros. Esta solução é pulverizada sobre o cromatograma.

Baseando-se no poder redutor do grupo S—H para os sais cúpricos, Feigl estabelece uma reacção («spot test») para os tióis [39]. O reagente é constituído por duas soluções, I e II, que se misturam em partes iguais imediatamente antes do teste; a solução I é constituída por uma solução de cloreto cúprico, cloreto de amónio e amónia em água; a solução II é uma solução de cloridrato de hidroxilamina em água a 20%. Com este reagente, os ácidos carboxitiólicos

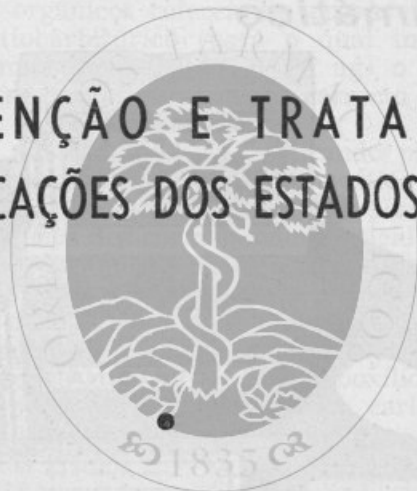
Rectofenicol

S U P O S I T Ó R I O S

ADULTOS

INFANTIL

NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO
DAS COMPLICAÇÕES DOS ESTADOS GRIPAIS



Centro de Documentação Farmacêutica

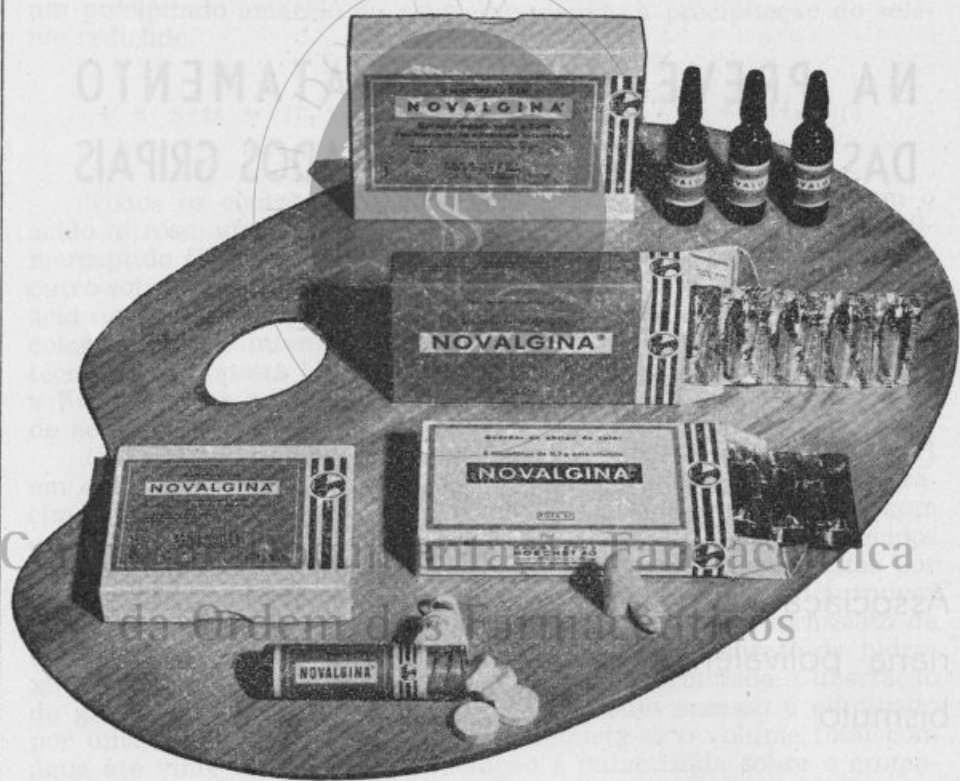
Associação de cloranfenicol com acção antibacteriana polivalente, sulfadiazina e cantocarbonato de bismuto

LABORATÓRIO ÚNITAS, LDA.

C. Correio Velho, 8 - LISBOA

NOVALGINA®

*analgésico
antipirético
antireumático*



HOECHST PORTUGUESA, S.A.R.L.

dão colorações que vão do castanho avermelhado ao amarelo acastanhado, produzindo precipitado quando o ácido está presente em concentração mais elevada [71]. Num artigo posterior, publicado em colaboração [67] o mesmo autor refere nova aplicação do efeito de Wohlers [106]. Na introdução deste artigo diz-se ser o método aplicável a, entre outros, ácidos sulfónicos e tioácidos orgânicos. Esta afirmação exclui, evidentemente, os ácidos carboxitiólicos pois, uma vez que a reacção descrita implica a formação de sulfatos por oxidação com o permanganato e os ácidos carboxitiólicos dão por oxidação dissulfuretos, o método descrito não pode ser-lhes aplicado. O mesmo poderá dizer-se para os ácidos carboditiónicos que, por oxidação dão compostos do tipo XX. Como os ácidos carboltiónicos não parecem ter existência livre, pode concluir-se que os autores [67] ao refrirem-se a tioácidos orgânicos referem-se, provavelmente a compostos como o ácido tiobarbitúrico (para o qual indicam para o método descrito um limite de detecção de 20 ug) o que, à luz do anteriormente exposto se nos afigura menos correcto proporcionado confusões.

Em cromatografia em camada fina, utilizando placas de sílica gel e eluentes como benzeno : metanol : ácido acético [48 : 8 : 4] ou clorofórmio : metanol : ácido fórmico [17 : 2 : 1], é possível a separação dos ácidos carboxitiólicos dos correspondentes ácidos carboxílicos separando-se, no entanto, bastante mal, os ácidos carboxitiólicos dos respectivos dissulfuretos [71]. A identificação das manchas não oferece dificuldade já que, mergulhando a placa numa atmosfera de iodo, as manchas correspondentes aos ácidos carboxitiólicos, se apresentam, ao contrário do que sucede com os ácidos carboxílicos fortemente descoradas, devido ao poder redutor dos ácidos carboxitiólicos, os quais, como já referido, são oxidados pelo iodo [71].

Para a revelação dos grupos S — H em geral, pode utilizar-se o ácido fosfomolibdico [41].

Reacções para a detecção de grupos S — H, mas susceptíveis de aplicação aos ácidos carboxitiólicos, são ainda referidas por outros autores [37, 38].

Centro de Documentação Farmacêutica
da Ordem dos Farmacêuticos

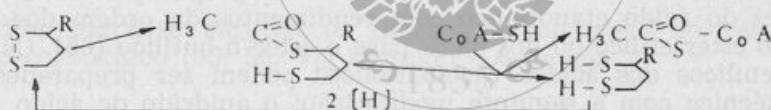
II — TIOLESTERES

É talvez a importância dos tiolesteres em bioquímica, o facto que explica o serem estes produtos bem mais conhecidos que os ácidos carboxitiólicos de onde derivam. A sua maior estabilidade e maior facilidade de preparação tornam-nos funções de mais fácil estudo.

Na realidade, desempenham estes compostos funções da maior importância bioquímica pois são responsáveis pela transferência de grupos acilo. O tiolester de maior importância é, sem dúvida, o acetilcoenzima A cuja fórmula se representa em XXXII.

Karlson [41], compara o papel desempenhado pelos tiolesteres em bioquímica aos anidridos e cloretos de ácido em química orgânica, uma vez que é através daqueles compostos, intermediários em muitas transformações metabólicas, que é possível ao organismo celular introduzir o grupo acilo em muitas moléculas frente às quais os ácidos seriam inertes ou exigiriam esforços metabólicos envolvendo maior quantidade de energia. Chama-lhes, por isso, «ácidos activados». São compostos, pelo menos bioquimicamente, muito ricos em energia aos quais está confiada a transferência do grupo acetilo, e dos radicais acilo dos ácidos gordos na sua degradação, biosíntese e biosíntese dos gliceridos. Mostram-se, assim, de menor estabilidade bioquímica que os correspondentes esteres dos ácidos carboxílicos.

O ácido tióctico, representado pela fórmula XXXIII, colabora também na transferência de radicais acetilo sob a forma de ester do ácido etanotióico [42], segundo o esquema



As especiais características do átomo de enxofre, já anteriormente referidas, a vizinhança do grupo $C=O$ fortemente polarizado, são, possivelmente, os responsáveis pela reactividade destes compostos.

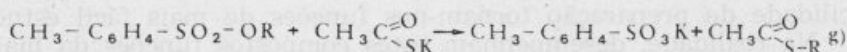
Entendemos como tiolesteres compostos que obedecem à fórmula geral XXI, também referidos na literatura como S-esteres ou, menos correctamente, como acilmercaptans.

Preparação

Podem preparar-se tiolesteres por reacção dos sais de potássio ou sódio dos respectivos ácidos carboxitiólicos com halogenetos de alquilo [49, 50]. Este método tem, sobretudo, interesse para a preparação indirecta de aminomercaptans cuja síntese oferece, por vezes, dificuldades que podem, deste modo, ser torneadas. Obtido o tiolester, o aminomercaptan é facilmente preparado [22, 83, 109, 110, 111].

A metilação de ácidos carboxitiólicos com diazometano fornece tiolesteres metílicos com bom rendimento [19, 71], sendo também viável a utilização do sulfato de dimetilo [112].

Um método interessante para a preparação de tiolesteres baseia-se na reacção de esteres do ácido p-toluenosulfónico com o etanotiolato de potássio segundo o esquema:



Os esteres a utilizar devem ser esteres de alcoóis primários já que os esteres de alcoóis secundários só em alguns casos reagem convenientemente [113].

Como já anteriormente vimos, a adição de ácidos carboxitiólicos a ligações insaturadas carbono-carbono dá origem a tiolesteres, sendo numerosos os trabalhos sobre o assunto [65].

A esterificação directa de ácidos carboxílicos por mercaptans é também possível e também neste caso, se estabelece um equilíbrio análogo ao que se verifica na esterificação de ácidos carboxílicos pelos alcoóis [112].

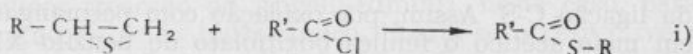
Para a preparação de tiolesteres a partir de anidridos de ácido e mercaptans são utilizáveis dois métodos: aquecimento a refluxo do mercaptan com uma mistura de anidrido de ácido e acetato de sódio [114, 115], ou deixando cair o anidrido sobre uma solução do mercaptan em hidróxido de sódio sob arrefecimento [116, 117]. Estes métodos foram utilizados com sucesso na preparação de diversos esteres do ácido etanotiólico com rendimentos da ordem dos 78 % para o ester etílico ou dos 95 % para o ester n-butílico [65]. Os esteres fenílicos dos ácidos carboxitiólicos podem ser preparados por esta técnica com a seguinte modificação: o anidrido de ácido reage com o tiófenol na presença de um ester monoalquilico do ácido carbónico [118].

Nós temos preparado tiolesteres por reacção dos cloretos de ácido com os mercaptans [71]. Esta técnica oferece, geralmente, bons rendimentos [45]. A reacção dá-se com facilidade, utilizando-se, por vezes, solventes anidros como éter [119], benzeno [120] ou o tetra-hidrofurano secos sobre fio de sódio. Vulgarmente a reacção efectua-se em presença da piridina anidra ou, menos frequentemente, em presença de uma amina terciária como a trimetilamina, a tributilamina ou a triisoamilamina [46, 47, 48, 121]. Alguns autores utilizam ainda o hidróxido de sódio 2N como catalizador [22]. Em alguns casos a reacção entre os cloretos de ácido e os mercaptidos de chumbo com [122] ou sem solvente [123] tem sido utilizada.

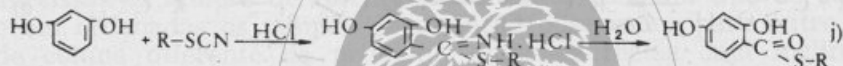
A utilização da reacção entre mercaptans e a cetena na obtenção de esteres do ácido etanotiólico não encontrou aplicação geral já que exige temperaturas muito baixas, tornando-se pouco prática [124]:



Fornecendo altos rendimentos, é ainda utilizável a reacção de cloretos [125, 126, 127] ou anidridos [65] de ácidos sobre o sulfureto de etileno ou derivados segundo o esquema:



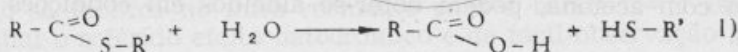
Um interessante método de preparação de tiolesteres aromáticos utiliza a reacção de Hoesch, através da qual também podem ser obtidas aminas. Trata-se de fazer reagir em determinadas condições experimentais o anisol ou éteres fenólicos com ele aparentados com o feniltiocianato ou ainda, fazer reagir o resorcinol ou o floroglucinol com o tiocianato de metilo, etilo ou n-butilo. Obtêm-se, nas condições descritas, cloretos de iminoesteres que, por hidrólise, conduzem a tiolesteres [51]:



O feniltiocianato dá iminoesteres estáveis com o resorcinol, floroglucinol e orcinol mas os aquil-derivados correspondentes, dão aminas por hidrólise [53, 54].

Propriedades químicas

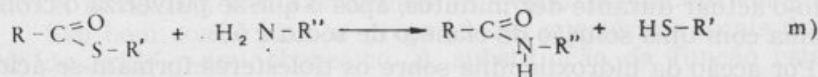
Por hidrólise alcalina os tiolesteres conduzem ao respectivo ácido carboxílico [55, 56, 17] segundo o esquema 1)



fornecendo, simultaneamente, o correspondente mercaptan. Podem, deste modo, os tiolesteres, ser intermediários na síntese de mercaptans doutro modo difíceis de sintetizar.

Como foi dito acima, os tiolesteres podem também actuar como agentes de acilação, propriedade fundamental da sua importância bioquímica.

Os tiolesteres reagem com as aminas como se mostra no esquema m) [125, 126, 127]. Segundo o mesmo esquema a reacção de tiolesteres com aminoácidos conduz à formação de peptidos.



A aminólise dos tiolesteres pode dar-se intramolecularmente, facto que pode ser com proveito utilizado em síntese como o mostra a preparação de XXIII a partir de XXII. A influência do pH neste tipo de reacção foi estudada [88].

Os reagentes de Grignard actuam sobre os tiolesteres de modo idêntico ao que se observa com os ésteres dos ácidos carboxílicos dando, como produtos finais, álcool terciário e mercaptan [128].

Frente aos oxidantes os tiolesteres sofrem o ataque oxidativo ao nível da ligação C-S. Assim, por oxidação com permanganato de potássio em meio acético o fenilcarboxitioato de benzilo XXIV dá origem a ácido benzóico e a ácido benzilsulfónico [129]. A oxidação do mesmo ester pelo ácido peroxiacético em acetonitrilo a 25° origina, no entanto, apenas ácido benzóico [130].

Com base em trabalhos de diversos autores [58, 59] foi possível verificar que era viável a preparação de aldeídos por redução catalítica de tiolesteres com níquel de Raney o que equivaleria a uma redução dos ácidos a aldeídos segundo o esquema n) podendo esta reacção considerar-se uma variante da reacção de Rosenmund.



A obtenção bem sucedida de benzaldeído, de propionaldeído e de D-ribosaldeído por este processo veio confirmar as esperanças postas no método. Porém, outros trabalhos no mesmo sentido, utilizando condições idênticas, conduziram a alcoóis como produtos finais. Verifica-se que a obtenção de alcoóis ou aldeídos está dependente da actividade do catalizador, podendo ser controlado o curso de reacção desde que se controle essa mesma actividade. Conclui-se que, utilizando um níquel de Raney nas condições habituais de dessulfurização os produtos finais obtidos são alcoóis [60, 61]. Porém, se o catalizador for parcialmente desactivado, o que pode conseguir-se por lavagem com acetona, podem obter-se aldeídos em condições satisfatórias.

A redução de tiolesteres foi estudada polarograficamente [31].

Propriedades analíticas

Foram desenvolvidos métodos colorimétricos de determinação de tiolesteres, baseados na coloração vermelho-violeta que se forma pela reacção dos tiolesteres com o nitroprussiato de sódio em meio alcalino [33], sendo possível aplicar métodos espectrofotométricos ao estudo cinético da cisão da ligação S-acilo [32]. O reagente de Grote pode revelar os grupos C-S-C- nos cromatogramas em papel [36] deixando-o actuar durante dez minutos, após o que se pulveriza o cromatograma com uma solução de cianeto de sódio a 5%.

Por acção da hidroxilamina sobre os tiolesteres formam-se ácidos hidroxâmicos originando-se, paralelamente, mercaptans [131]. Esta propriedade foi aproveitada para a revelação de manchas correspondentes a tiolesteres em cromatografia em papel. O cromatograma é pulverizado com uma solução 4N de hidroxilamina; o ácido hidroxâmico resultante dá coloração vermelha com uma solução consti-

tuída por uma mistura em partes iguais de uma solução de cloreto férrico a 5% com uma solução de ácido tricloroacético a 15% e ácido clorídrico 3N [35]. Embora a reacção não seja específica, uma vez que reacção idêntica pode ser utilizada na identificação de ácidos carboxílicos (reacção de Angelli-Rimini), neste caso, paralelamente à formação de ácido hidroxâmico, liberta-se o respectivo mercaptan cuja caracterização completa a identificação do tiolester. Para a identificação do mercaptan libertado pode utilizar-se a reacção com o anidrido 3-nitroftálico que conduz à formação do respectivo mono-tiolester o qual, por ter ainda um grupo carboxilo livre pode ser titulado [132].

Os tiolesteres dão com o acetato de mercúrio em solução alcoólica e por adição de uma solução de sal comum a 20 % um precipitado de cloreto de mercaptomercúrio XXV.

A identificação funcional dos tiolesteres é possível em cromatografia gás-líquido. Traçando um gráfico em que se registam em abscissas os tempos de retenção verificados com um tipo de coluna e em ordenadas os tempos de retenção observados para outro tipo de coluna diferente da primeira, obtêm-se rectas cuja inclinação depende do grupo funcional [133]. O método permite identificar a função tiolester e distingui-la do correspondente ester carboxílico [71].

Propriedades espectrais

Comparando espectros de Ultra-violeta dos tiolesteres com os dos correspondentes esteres carboxílicos, verifica-se um efeito batocrómico pela introdução do átomo de enxofre [71, 134]. O mesmo efeito se verifica no infra-vermelho para a banda C=O «stretching» na qual o referido efeito batocrómico é de fácil observação [71].

Propriedades farmacológicas

O ester dietílico do ácido m-fenildicarboxilico XXVI é um líquido amarelo pálido, oleoso de ponto de ebulição 210° - 212° a 15 mm Hg. Foi utilizado no tratamento da lepra e da tuberculose [13].

O «Di-allate» (XXVII) é o ester 1,2-dicloroalílico do ácido N-diisopropiltiolcarbâmico; é utilizado como herbicida e a sua ingestão de mistura com o álcool provoca intensa vasodilatação da face, taquicardia, dispneia, náuseas e vômitos, seguindo-se palidez e hipotensão. É semelhante ao «Antabuse» (XXVIII) na sua toxicologia.

São bem conhecidas as propriedades anestésicas locais dos ésteres do ácido p-aminobenzóico. A substituição da função ester por uma função tiolester tem influência na actividade do composto [63]. Assim, a tiocaína representada pela fórmula XXIX é descrita como actuando mais rapidamente e sendo menos tóxica que o correspondente ester do ácido p-aminobenzóico [62]. Foram tentadas ainda, substituições no átomo de azoto, verificando-se que os derivados

N,N-di-n-amilo, N,N-di-n-butilo e N,N-di-alilo eram mais activos que os derivados em que o átomo de azoto apresenta substituintes alquílicos de cadeia menor. Parece, no entanto, que estes derivados sulfurados não são destituídos totalmente de efeito irritante sobre as mucosas.

Foram também sintetizados esterres do ácido 1-naftalenocarboxi-tiólico [XXX] e do ácido 4-aminonaftaleno-1-carboxitiólico os quais, pelos resultados obtidos, foram julgados suficientemente interessantes para poderem ser utilizados na prática [64].



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

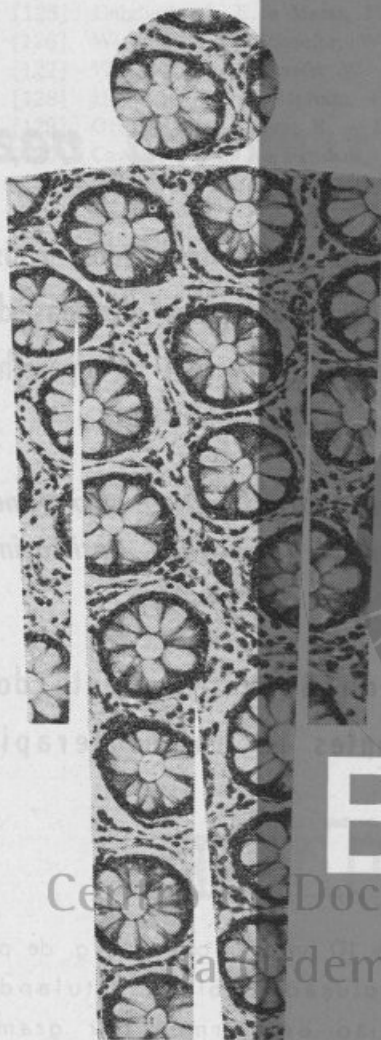
Ao Exmo. Senhor Professor Doutor Lício da Silveira Godinho quero manifestar o meu reconhecimento pelo interesse que sempre manifesta pelo trabalho dos seus colaboradores e cuja orientação e oportunos conselhos tornaram possível a publicação deste meu trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hickinbottom, W. J. — «Reactions of Organic Compounds», Longmans, London 1959.
- [2] Jenkin, G. L. e Hartung, W. H. — «Organic Medical Compounds», John Wiley & Sons, N. Y. 1949 — Tradução espanhola: Marin, Barcelona.
- [3] Levene, P. A. e Mikeska, L. A. — J. Biol. Chem. **70** 365-80 (1926).
- [4] Block, R., Durrum, E. L. e Zweig, G. — «A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis», Academic Press Inc. N. Y. 1958.
- [5] Fieser e Fieser — «Química Orgânica», 3.^a ed., Grijalbo, Mexico 1965.
- [6] Adam, R. — «Organic Reactions», Vol. VI, John Wiley & Sons, 1951.
- [7] Dupont, Locquin, R. e Ourisson, G. — «Monographies de Chimie Organique», Vol. I, Masson, Paris.
- [8] Tasker, H. Jones, H. O. — J. Chem. Soc. 1909 **95** (1917).
- [9] Vorlaender, D. e Mittag, E. — Ber. **52** 421 (1919).
- [10] Reinholdt, H. — Ber. **59** 1311 (1926).
- [11] Shriner, R. L. e Fuson, R. C. — «The Systematic Identification of Organic Compounds — A Laboratory Manual», 3.^a ed., John Wiley & Sons, N. Y. 1948.
- [12] Clarke, H. T. e Collie, J. N. — «Manual de Analisis Organico Cuantitativo», Marin, Barcelona, 1945.
- [13] Index Merck, 8.^a ed. Merck & Co. Inc. Achaway, N. Y. 1968.
- [14] Roberts, J. e Caserio, M. — «Basic Principles of Organic Chemistry», W. A. Benjamin Inc., N. Y. 1965.
- [15] Cottrel, T. L. — «The Strengths of Chemical Bonds», Butterworth, London, 2.^a ed. 1958.
- [16] Pauling, L. — «The Nature of Chemical Bond», Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 3.^a ed. 1960.
- [17] Tarbell, D. S. e Harnish, D. P. — Chem. Revs. **49** 45-64 (1951).
- [18] Kirk e Othmer — «Enciclopedia Tecnologia de Química», Vol. 15, 1965.
- [19] Arndt, F. e Bekir, M. — Ber. **63B** 2390-3 (1951).
- [20] Sunner, S. e Nilson T. — Svenk. Kem. Tid. **54** 163-7 (1942).
- [21] Sunner, S. e Nilson, T. — Chem. Zentr. I 829 (1943).
- [22] Tchoubar, B. e Letellier-Dupré — Bull. Soc. Chim. France 792-4 (1947).
- [23] Cronyn, M. W. e Jiu, J. — J. Am. Chem. Soc. **74** 4726 (1952).
- [24] Sakurada, Y. — Abs. 950 (1926); 133, 134, (1917); 159 (1928).
- [25] Wheeler, H. L. — J. Am. Chem. Soc. **23** 443 (1901).
- [26] Pawlewski, B. — Ber. **31** 661 (1898).
- [27] Framm, E. e Schmoltdt, P. — Ber. **40** 2862 (1907).
- [28] Wheland, G. W. — «Ressonance in Organic Chemistry», John Wiley & Sons, N. Y. 1955.
- [29] Behringer, H. e Kley, W. — Ann. **595** 160-8 (1953).
- [30] C. A. 44 1902 c.
- [31] Meyer, R., Scheithauer, S. e Kunz, D. — Ber. **99** (4) 1393-413 (1966).
- [32] Wieland, T. e Hornig, H. — Ann. **600** 12 (1956).
- [33] Lynen, F. — Ann. **574** 33 (1951).
- [34] Werner, A. E. A. — Sci. Proc. Roy Dublin Soc. **22** 387-92 (1942).
- [35] Lederer, E. — «Monographies de Chimie Organique», Vol. I, Chromatografie II, Masson & Cie, Paris 1959.

- [36] Grote, I. W. — *J. Biol. Chem.* **93** 25 (1931).
- [37] Toennis, G. e Kolb, J. J. — *Anal. Chem.* **23** 823 (1951).
- [38] Stadtman, E. R. — *J. Biol. Chem.* **203** 501 (1953).
- [39] Feigl, F. — «Spot Tests in Organic Analysis», Elsevier, Amsterdam 1956.
- [40] «Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel», E. Merck AG, Darmstadt.
- [41] Vernin, G. — «La Chromatographie en Couche Mince — Techniques et application en Chimie Organique», Durand, Paris 1970.
- [42] Neimysheva, A. A. e Knunyants, I. I. — *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **181** (4) 888-91 (1968), *C. A.* **69** 91515 k.
- [43] Karlson, P. — «Kurzes Lehrbuch der Biochemie», 6.^a ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967.
- [44] White, Handler, Smith, Stetten — «Principles of Biochemistry», 2.^a ed. Kogakusha, Tokio 1959.
- [45] Adams, R. — «Organic Reactions», Vol. III, John Willey & Sons, N. Y. 1954.
- [46] Wolfrom e Karabinos — *J. Am. Chem. Soc.* **68** 1455 (1946).
- [47] Jeger, Norynberski, Szpilfogel e Prelog — *Helv. Chim. Acta*, **29** 684 (1946).
- [48] Levin, McIntosh, jr. Spero, Rayman, Meinzer — *J. A. Chem. Soc.* **70** 511 (1948).
- [49] Owen, L. N. — *J.* **244-248**, 1949; **591** (1950).
- [50] Khalestski, A. M. e Yanovitskaya, A. M. — *C. A.* **44** 2952 (1950).
- [51] Adams, R. — «Organic Reactions», Vol. V, John Willey & Sons, N. Y. 1949.
- [52] Kaufman e Adams — *J. Am. Chem. Soc.* **45** 1745 (1923).
- [53] Borsche e Niemann — *Ber.* **62** 1743 (1929).
- [54] Vogel, A. — «Practical Organic Chemistry», 3.^a ed. Longmans, London, 1962.
- [55] Bloch, F. — *Compt. rend.* **206**, 279 (1938).
- [56] Matsu, M. — *Abs.* 1261 (1912).
- [57] Cronyn, M. W. e al. — *J. A. Chem. Soc.* **77** 3031 (1955).
- [58] Bougault, Catellain, Chrabier — *Compt. rend.* **208** 657 (1939).
- [59] Wolfrom e Karabinos — *J. Am. Chem. Soc.* **66** 909 (1944).
- [60] Spero, McIntosh jr. e Levin J. — *J. Am. Chem. Soc.* **70** 1907 (1948).
- [61] McIntosh jr., e Levin — *J. Am. Chem. Soc.* **71** 3317 (1949).
- [62] Liescher e Jordan — *J. A. Chem. Soc.* **59** 623 (1937).
- [63] Kaufman, H. P. — «Medicaments de Synthèse», Masson & Cie., Paris, 1957.
- [64] Ssergijenskaya — *J. Gen. Chim. URSS* **10** 1737 (1940) *Chem. Zentr.* **II** 1852 (1941).
- [65] Schoebel, A., Wagner, A. — «Herstellung und Umwandlung von Thiosaeuren und ihren Derivaten» in *Methoden der Organischen Chemie* **9** 1955.
- [66] Wagner, A. — «Zur Nomenklatur der Schwefelverbindungen», in *Methoden der Organischen Chemie* **9** 1955.
- [67] Feigl, F., Souza Campos, I. T. e Ladeira Dalto, S. — *Analytical Chem.* **36**, 1657 (1964).
- [68] Lin'Kova, M. G., Gapanovich, L. T. Knunyants, I. L. — *Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim.* **1668** (8) 1886-7; *C. A.* **70** 3223 f (1969).
- [69] Bloch, F. — *Compt. rend.* **204** 1342 (1937).
- [70] Crouch, W. W. — *J. An. Chem.* **74** 2926 (1952).
- [71] Chaves das Neves, H. J. — Laboratório de Química Orgânica Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Lisboa — Trabalho não publicado.
- [72] Hantzsch, A. e Scharf E. — *Ber.* **46** 3570 (1913).
- [73] Frega, A. e Bauer, H. — *Ark. Ke.* **2** 113 (1950).
- [74] Adkins, H. e Thompson, Q. E. — *J. A. Chem., Soc.* **71** 2242 (1949).
- [75] Borgeson, R. W. e Wilkinson, J. A. — *J. An. Chem. Soc.* **51** 1452 (1959).
- [76] Jacquemin, E. e Cosseimann — *Compt. rend.* **49** 371 (1859).

- [77] Holmberg, B. e Schjanberg, E. — Ark. Ke. 14 n.º 7 (1940).
- [78] Noble, P. e Tarbel, D. S. — «Organic Syntheses», 32 101 1952, Engelhardt Latschinow, P. e Malyschew, S. Z. 354 (1868).
- [79] Sachs, J. H. e Reis, E. E. — J. Am. Chem. Soc. 38 2748 (1906).
- [80] Bloch, J. e Bergmann, M. — Ber. 53 975 (1920).
- [81] Szperl, L. — Chem. List 26 444 (1932).
- [82] Ellingboe, E. K. — «Organic Syntheses», John Wiley & Sons, N. Y. 1951, Vol. 31, Pág. 105.
- [83] Kym, O. — Ber. 32 3535 (1899).
- [84] Sjoeborg, B. — Svensk. Kem. tid. 63 90-4 (1951); C. A. 47 8640.
- [85] Para a preparação vd. Wieland, T., Schaefer, W. e Bokelman, E. - A. 573, 99 (1951).
- [86] Weigert, F. — Ber. 36 1007 (1903).
- [87] Hawkins, P. J., Tarbell, D. S. e Noble jr. — J. Am. Chem. Soc. 75 4462 (1953).
- [88] Schweyzer, R. — Helv. Chim. Acta 36 414 (1953).
- [89] Sheehan, J. C. e Johnson, D. A. — J. Am. Chem. Soc., 74 4726 (1952).
- [90] Engelhardt, Latschinoff e Malyscheff — Z. Chem. 4 353 (1858).
- [91] Engelhardt e Latschinoff — Z. Chem. 4 455 (1868).
- [92] Cloez — Ann. 115, 23 (1860).
- [93] Moeness, Lott e Christiansen — J. A. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 25 397 (1936).
- [94] Shelton e Rider — J. Am. Chem. Soc. 58 1282 (1936).
- [95] Chakravati — J. Chem. Soc. 964 (1923).
- [96] Rider e Shelton — C. A. 30 1811 (1936).
- [97] Bergman e Bloch — Ber. 53 977 (1920).
- [98] Pawlewsky, B. — Ber. 35 110 (1902).
- [99] Eibner, A. — Ber. 34 657 (1901).
- [100] Reid E. E. — Am. 43 495 (1910).
- [101] Stewart, F. B. e McKinney, P. V. — J. Am. Chem. Soc. 53 1482 (1931).
- [102] Behringer, H. — Ann. 564 219-34 (1949).
- [103] Bader, H. e Cross, L. C. e Heilbron, I. M. e Jones I. R. H. Soc. 619 (1949).
- [104] Wieland, T., Lambert, R., Lang U. e Schramm, G. — Leibig Ann. Chem. 595 181 (1955).
- [105] Walker, G. T. — Industries parfum 10, 236. (1955).
- [106] Wohlers, H. E. Z. — Anorg. Allgem. Chem. 59 203 (1908).
- [107] Pastuska, Petrowith, H. J. — Chem. Ztg. 88 311 (1964).
- [108] Heilbron, I. e Bunburry, H. M. — «Dictionary of Organic Compounds» Eyre & Spottiswoode, London 1953.
- [109] Brintzinger, H. e Pfannstiel K. e Koddebusch H. — Ber. 83 87 (1950).
- [110] Biilmann, E. e Due, N. V. — Bul. Soc. Chim. France (4) 35 384 (1954).
- [111] Kimball, J. W. e Reid E. E. — J. Am. Soc. 38 2758 (1916).
- [112] Pratt, L. S. e Reid E. E. — J. Am. Soc. 37 1934 (1915).
- [113] Chapman, J. H. e Owen, L. N. — J. Am. Chem. Soc. 579 (1950).
- [114] Zincke, T. e Mueller, G. — Ber. 46 778 (1913).
- [115] Lowry, T. M. e Domington, G. C. — Soc. 83 479.
- [116] Hinsberg, O. — Ber. 32 2433 (1906).
- [117] Owen, L. M. e Miles, L. W. C. — J. Chem. Soc. 817 (1952).
- [118] Wieland T., Schaefer W. e Bokelman, E. — A. 573 99 (1951).
- [119] Arndt, F. Mild, E. e Eckert, G. — Ber. 56 1982 (1923).
- [120] Seer, C. e Weitzenbock, R. — M. 31 377 (1910).
- [121] Ralston, A. W., Segebrecht, E. W. e Bauer S. T. — J. Org. Chem. 4 503 (1939).
- [122] Obermeyer, J. — Ber. 20 2918 (1887).



O ANTIBIÓTICO
QUE APARECE
NOS TECIDOS

BIOCINA

(DOXICICLINA)

DA FORMA + RÁPIDA
EM CONCENTRAÇÃO + ELEVADA
DURANTE + TEMPO

APRESENTAÇÕES:

Cápsulas a 100 mg de doxiciclina
Frascos de 5 a 10
Suspensão oral extemp. à 50 mg
de doxiciclina por 5 ml
(colher-medida) Frs. de 60 ml



LABORATÓRIOS

Pela primeira vez

fermentos lácticos vivos, liofilizados, resistentes, às concentrações mais elevadas de antibióticos que se encontrem no aparelho digestivo, nomeadamente de

penicilina, estreptomicina, neomicina, cloranfenicol, tetraciclina, bacitracina e eritromicina

Prevenção e tratamento dos
acidentes da antibioterapia



antibiophilus

Caixa de 10 ampolas com 1,50 g. de pó, para solução bebível, titulando um bilião de germes por grama

Registo N.º 786 na Direcção-Geral de Saúde
(Decreto N.º 41 448)

CENTRO DE LIOFILIZAÇÃO
FARMACÉUTICA

MALAKOFF (FRANÇA)

REPRESENTANTES:

GIMENEZ-SALINAS & C.ª

Av. dos Estados Unidos da América, 10

LISBOA-5

- [123] Rivier, H. e Richard, P. — *Helv. Chim. Acta* **8** 490 (1925).
[124] Hurd, C. D. e Williams J. W. — *J. Am. Chem. Soc.* **58** 962 (1934).
[125] Delgliesh, C. E. e Mann, F. G. — *J. Chem. Soc.* 7559 (1947).
[126] Wieland, T. e Schaefer, W. — *Anorg. Chemie* **63** 146 (1951).
[127] Wieland T. e Schaefer W. — *A.* **576** 104 (1952).
[128] Hepworth H. e Clapham, H. W. — *J. Chem. Soc.* **119** 118 (1921).
[129] Otto, R. e Lueders, R. — *Ber.* **13** 1285 (1880).
[130] Cavaletto, C. J. e Frueauf, D. M. — *J. Am. Chem. Soc.* **71** 2248 (1949).
[131] Noda, L. H., Kuby, S. A. e Lardy, H. A. — *J. Am. Chem. Soc.* **71** 2248 (1949).
[132] Wertheim, E. — *J. Am. Chem. Soc.* **51** 3661 (1929).
[133] Keulemans, A. I. M. e Cremer, E. — «*Gas Chromatographie*», Verlag Chemie Weinheim 1959.
[134] Purvis, Jones e Tasker — *J. Chem. Soc.* **97** 2287 (1910).



Centro de Documentação Farmacêutica da Ordem dos Farmacêuticos

ECOS E FACTOS

Divulgando...

● A pedido dos Serviços Administrativos da Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos transcrevemos, com o maior prazer, o Regulamento para concessão de subsídios de Formação e Aperfeiçoamento Profissional:

Artigo 1.º — A fim de contribuir para o progresso tecnológico das actividades económicas que lhe estão afectas, a Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos subsidiará estágios e estudos no país e no estrangeiro a levar a efeito por técnicos de nacionalidade portuguesa, habilitados com um curso de grau superior ou médio.

§ único — Os subsídios da Comissão Reguladora dos Produtos Químicos e Farmacêuticos poderão ser concedidos em reforço de subsídios a conceder pelos Grémios que representam as referidas actividades.

Artigo 2.º — O quantitativo mensal dos subsídios será fixado em cada caso, segundo o país e o local do estágio.

§ 1.º — Os subsídios incluem o pagamento das viagens de ida e volta por caminho de ferro (1.ª classe) ou via aérea (classe turística).

§ 2.º — Se o subsidiado se deslocar por meios próprios, receberá o equivalente ao custo da viagem por caminho de ferro ou por via aérea.

Artigo 3.º — São condições de concessão dos subsídios além das que forem indicadas para cada caso, as seguintes:

- a) idade não superior a 45 anos;
- b) formação profissional adequada à natureza do trabalho a realizar;
- c) apresentação de um plano de trabalhos, do qual constem, explicitamente, os objectivos propostos e a forma de os realizar;
- d) apresentação do «curriculum vitae» que deverá indicar classificação do curso, prémios, e bolsas de estudo que lhe tenham sido atribuídos;
- e) conhecimento da língua do país onde deverá ter lugar o estágio.