

*Revista
Portuguesa
de
Química*

Editada pela
SOCIEDADE
PORTUGUESA
DE QUÍMICA
E FÍSICA



VOL. IV

JUNHO 1962

N.º 1

Revista Portuguesa de Química

Editada por

Sociedade Portuguesa de Química e Física
em continuação da

Revista de Química Pura e Aplicada

FUNDADA POR FERREIRA DA SILVA

Director: A. Herculano de Carvalho

Editor: J. Oliveira Cabral

VOL. IV

JUNHO DE 1962

N.º 1

Índice:

Secção A:

EFEITO DA HORMONA DO CRESCIMENTO NA SÍNTESE DOS LÍPIDOS — *Renato da Silva Leal* 3

Secção C:

ALGUNS PONTOS SINGULARES DA QUÍMICA ANALÍTICA — *A. Herculano de Carvalho*... .. 79

ESTATUTOS DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA E FÍSICA — *Aprovados em Assembleia Geral de 28 de Junho de 1926* 89

*Revista
Portuguesa
de
Química*

Editada pela
SOCIEDADE
PORTUGUESA
DE QUÍMICA
E FÍSICA

VOL. IV

1962

EFEITO DA HORMONA DO CRESCIMENTO NA SÍNTESE DOS LÍPIDOS

por

RENATO DA SILVA LEAL (*)

University College, Department of Biochemistry
Londres - Inglaterra

1 — INTRODUÇÃO

Embora nos últimos anos se tenha assistido a grandes progressos no conhecimento dos mecanismos pelos quais os ácidos gordos e os lípidos complexos são oxidados e sintetizados no organismo, por enquanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos de controle que influenciam estes processos. Além de factores termodinâmicos, tais como as razões entre as formas oxidada e reduzida dos nucleotidos de piridina e as reacções de equilíbrio dos vários enzimas envolvidos no processo, parece não haver dúvida que factores hormonais desempenham um papel decisivo.

As formas diferentes do corpo do macho e da fêmea das várias espécies e as variações entre indivíduos do mesmo sexo submetidos a dietas semelhantes, parecem indicar qualquer forma de influência endócrina. Além disso, condições patológicas como o síndrome de Fröhlich e a doença de Cushing podem ser atribuídas a lesões do sistema endócrino. Parece não haver dúvida que as hormonas da hipófise anterior desempenham um papel importante nos processos de controle, e em particular, a hormona do crescimento, tem mostrado influenciar não só o crescimento e o metabolismo das proteínas (Li, Simpson e Evans, 1949; Young, 1945), mas também o metabolismo dos lípidos (Young, 1945; Greenbaum, 1953; Greenbaum e McLean, 1953 a; Greenbaum, 1956).

(*) Bolseiro dos C. E. E. N. do Instituto de Alta Cultura. Endereço actual: Faculdade de Ciências de Lisboa.

Experiências *in vitro* usando carbono 14 e deutério como marcadores da molécula dos lípidos têm conduzido a resultados que levam a crer que a hormona do crescimento exerce uma acção inibidora na síntese dos lípidos no fígado. No entanto, a maioria dos autores que se têm ocupado deste problema, estudaram o efeito da hormona na incorporação de precursores dos lípidos na fracção constituída pela totalidade dos ácidos gordos, isto é, nos ácidos obtidos por saponificação da totalidade dos lípidos. Aquela fracção é portanto constituída por alguns ácidos gordos livres, mas principalmente pelos ácidos provenientes dos triglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos e ésteres do colesterol, o que não permite estudar uma determinada classe de lípidos em particular e torna difícil a interpretação dos resultados.

Embora os nossos conhecimentos sobre os efeitos da hormona do crescimento no metabolismo dos lípidos tenham aumentado grandemente nos últimos anos, muito pouco se sabe ainda sobre o modo como a hormona produz aqueles resultados; em particular, o seu efeito na lipogénese não está ainda esclarecido e ignora-se quais as reacções envolvidas na síntese dos lípidos, que são afectadas pelo tratamento hormonal.

Em vista da expansão dos conhecimentos dos processos biosintéticos dos ácidos gordos e fosfolípidos, em grande parte através dos trabalhos de Lynen, Green, Kennedy e outros, pensámos que um exame da natureza do efeito da hormona do crescimento na síntese dos fosfolípidos pudesse conduzir à identificação da reacção enzimática influenciada pela hormona.

Com este fim em vista, investigámos a síntese dos fosfolípidos em ratos normais e submetidos ao tratamento da hormona do crescimento, a partir de vários precursores marcados, estudando separadamente cada uma das reacções do esquema descrito por Kennedy (1957) para a biosíntese dos fosfolípidos no fígado.

Paralelamente foi investigado o efeito da hormona do crescimento na biosíntese do colesterol.

2 — A HORMONA DO CRESCIMENTO DA HIPÓFISE

2.1 — A hormona do crescimento como uma entidade individual

Há cerca de 40 anos Evans e Long (1921) administraram lobos anteriores da hipófise, por via oral, a ratos normais, não tendo observado qualquer efeito sobre o crescimento. Prepararam então um triturado da mesma glândula que injectaram em ratos durante um longo período de tempo e verificaram um aumento de peso dos animais assim tratados em relação a animais testemunhas.

Que a hipófise anterior segrega uma hormona que promove o crescimento (hormona do crescimento, hormona somatotrópica ou somatotropina) foi confirmado por experiências que mostraram que a remoção da hipófise ou uma deficiência natural do lobo anterior daquela glândula, provocavam um atraso no crescimento.

Smith (1930), que introduziu pela primeira vez um método simplificado de hipofisectomia no rato, mostrou que a remoção da hipófise de animais jovens provocava uma inibição do crescimento do esqueleto e uma diminuição de peso do cortex suprarenal, tiróide, órgãos reprodutores, fígado, baço e rins. Além disso, não se observava qualquer aumento de peso nos animais assim tratados, por outras palavras, a hipofisectomia punha um termo ao crescimento. Por outro lado, a implantação de tecido da hipófise anterior ou a injeção de extractos daquela glândula, provocavam uma aceleração do crescimento em animais normais ou aos quais tinha sido previamente removida a hipófise. Durante os 15 anos que se seguiram à publicação destes resultados as opiniões divergiram quanto à possibilidade de existência de uma hormona do crescimento como uma entidade individual. Outras hormonas da hipófise, como a prolactina e a hormona tirotrópica, são também capazes de promover o crescimento em ratos anões, isto é, uma espécie de ratos que sofrem de um tipo de hipofisectomia congé-

nita (Bates, Loanes e Riddle, 1935), e Schooley, Riddle e Bates (1938) mostraram que a prolactina era capaz de manter o peso normal em pombos aos quais tinha sido removida a hipófise.

Li, Evans e Simpson (1945) afirmaram que a demonstração final da existência de uma hormona do crescimento como uma entidade individual, podia apenas ser obtida se se dispusesse de uma hormona livre de outros componentes biologicamente activos e de outras proteínas inertes.

A extracção e purificação de uma hormona do crescimento, a partir de hipófises de vacas, e que obedecia àqueles requisitos, foi primeiramente anunciada por Li e Evans (1944), e no ano seguinte Li, Evans e Simpson (1945) descreveram um processo de extracção e purificação da hormona, a partir da mesma origem e baseado no fraccionamento salino e precipitação isoeléctrica. O produto, aparentemente livre de outras hormonas, quando injectado em animais hipofisectomizados, provocava neles um aumento de peso. A proteína assim preparada tinha um ponto isoeléctrico 6,8 e a sua actividade era parcialmente destruída pela pepsina e tripsina. As suas características físicas foram determinadas por vários processos, incluindo medições electroforéticas e de ultracentrifugação (Li e colaboradores, 1945; Li e Moskowitz, 1949). Li e colaboradores (1948) mostraram também o papel essencial da tirosina, um dos resíduos aminados da hormona.

É hoje geralmente aceite que a actividade promotora do crescimento dos extractos da hipófise anterior é devida a uma proteína individual, isto é, uma proteína livre de impurezas biologicamente activas, e que medições de solubilidade, difusão e electroforéticas mostraram ser homogénea (Li e Evans, 1944; Li, Evans e Simpson, 1945; Li e Evans, 1948 a).

2.2 — O problema do rendimento e do grau de pureza

O método desenvolvido pelo laboratório de Berkeley para a preparação da hormona, conduzia, no entanto, a rendimentos demasiado baixos (cerca de 60 mg por quilograma de glândula) e, embora fornecendo material útil para estudos de caracterização, revelava-se bastante inadequado quando se pretendiam investigações em larga escala.

Esta situação foi melhorada em 1948 quando Wilhelmi, Fishman e Russel descreveram um novo método de preparação, de novo baseado na extracção de hipófises frescas de vacas, mas usando hidróxido de cálcio como meio extractor e fraccionamento dos extractos com etanol a baixa temperatura. Os extractos assim preparados eram, após precipitação pelo etanol, redissolvidos em solução diluída de cloreto de potássio e grande parte das impurezas precipitada a pH 5,0. O restante era submetido a precipitação fraccionada pelo etanol, partindo de pH 8,5, obtendo-se assim uma proteína no estado cristalino.

Por este processo, o rendimento era bastante aumentado e o produto obtido era puro do ponto de vista electroforético e possuía um elevado grau de actividade.

Li, Evans e Simpson (1948) cristalizaram a sua preparação amorfa usando técnicas semelhantes, confirmaram a pureza do produto e mostraram que a preparação amorfa pura e o produto cristalino não diferiam nas suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Em 1955 Wilhelmi descreveu uma modificação do método preparatório que permite obter rendimentos ainda mais elevados.

Os trabalhos mais recentes sobre os efeitos metabólicos da hormona do crescimento têm sido efectuados usando preparações com um elevado grau de pureza. Embora estas preparações não sejam totalmente isentas de contaminações, estas encontram-se, na verdade, em quantidades demasiado pequenas, dadas as doses de hormona de crescimento usadas, para poderem ter qualquer efeito apreciável. Este facto é de uma importância enorme em trabalhos deste género, visto que extractos ou preparações impuras contém frequentemente contaminantes que, mesmo em pequenas quantidades, são muito activos e podem actuar sinérgicamente com o componente principal.

Há pelo menos 6 hormonas na hipófise anterior, das quais 5 já foram isoladas no estado puro (Li, 1950-51). Das 6 hormonas, 3 são gonadotrópicas, e as restantes são as hormonas do crescimento, tirotrópica e adrenocorticotrópica (ACTH) respectivamente. A ausência desta última é de particular importância no presente trabalho em vista do possível papel do cortex suprarenal no metabolismo dos lípidos (Welt e Wilhelmi, 1950).

Levin e Farber (1952) discutiram o efeito da hormona do crescimento e da ACTH na mobilização de gordura para o fígado e mostraram que animais suprarenalectomizados não respondiam a injeções de hormona do crescimento no que diz respeito a mobilização de gordura para o fígado. Experiências com esteróides suprarenais, no

entanto, não foram capazes de mostrar quaisquer efeitos no que diz respeito a mobilização de gordura para o fígado e aqueles autores sugeriram que aquele efeito só era obtido com o conjunto de 2 hormonas, a hormona do crescimento e uma hormona suprarenal. Isto põe em evidência a importância da ACTH como um factor sinérgico em estudos sobre a influência da hormona do crescimento no metabolismo dos lípidos. Estes resultados, contudo, não foram confirmados posteriormente, e em experiências mais recentes Szego (1952) e Loraine (1952) apresentaram resultados sugerindo que o cortex suprarenal não desempenha um papel essencial neste processo. Contudo, em vista dos resultados até certo ponto contraditórios, é aconselhável eliminar, tanto quanto possível, possíveis complicações devidas a contaminações pela ACTH. Felizmente, há fortes razões para acreditar que a contaminação da hormona do crescimento, preparada pelo método de Wilhelmi, por outras hormonas da hipófise, é mínima, em vista dos estudos daquele autor sobre a homogeneidade electroforética e de ultracentrifugação daquela proteína.

2.3 — A natureza do «crescimento» provocado pela hormona do crescimento da hipófise

Em virtude das ideias, até certo ponto discordantes, que prevalecem sobre a natureza das actividades promotoras do crescimento da hormona do crescimento da hipófise, parece-nos apropriado nesta altura estabelecer, em termos gerais, a natureza da hormona a que este trabalho se refere.

Como resultado do trabalho pioneiro de Evans e Long (1921) o termo «hormona do crescimento» parecia apropriado e o isolamento de uma simples proteína homogénea que revelava uma actividade promotora do crescimento bem marcada, apoiava aquele nomenclatura. Nos últimos anos, contudo, tem-se tornado cada vez mais aparente que o termo bastante vago «hormona do crescimento» pouco indicação nos dá sobre as funções metabólicas desta proteína.

Weiss (1955) descreve crescimento como «the surplus accruing in the balance sheet of a complex account». Diversos fenómenos são abrangidos pelo termo crescimento, incluindo aumentos de volume, lineares, de peso e os resultantes dos processos reprodutores. O verda-

deiro significado do termo não nos preocupa neste momento, mas deve ter-se presente que a terapêutica pela hormona do crescimento não conduz a um aumento proporcional das diversas partes do organismo. Em particular, os órgãos endócrinos não aumentam em tamanho proporcionalmente ao peso total do corpo (Greenbaum e Young, 1950; Greenbaum e Young, 1953). Por outro lado, a nomenclatura é demasiado restrita. Li (1956) salienta que a existência de princípios glicotrópicos, diabéticos e cetogénicos têm sido atribuídos a preparações purificadas de hormona do crescimento ricas em actividade promotora do crescimento. Sabe-se hoje que todas estas propriedades são atribuíveis à própria hormona do crescimento. Aquele autor prefere o termo somatotropina.

Talvez a hormona do crescimento possa melhor ser descrita como «uma substância preparada a partir do lobo anterior da hipófise e que aumenta a massa total do material não aquoso em animais experimentais apropriados».

2.4 — A hormona do crescimento e a composição do organismo

Um dos primeiros passos na elucidação do mecanismo da acção da hormona do crescimento foi o estudo das modificações que ela provocava na composição do organismo.

Estudos sobre as modificações na composição do organismo de ratos tratados com extractos da hipófise mostraram um aumento em água e proteínas e um decréscimo dos lípidos (Bierring e Nielsen, 1932).

Ficava no entanto de pé a possibilidade de os efeitos observados no tratamento com extractos do lobo anterior da hipófise, serem devidos, não a uma acção específica sobre o crescimento, mas apenas a uma estimulação do apetite.

Em 1934, Lee e Schaffer usaram a técnica da alimentação controlada, em que os animais eram alimentados com uma ração diária constante, apenas suficiente para, na ausência do tratamento pela hipófise, manter um peso constante. Foi possível verificar que nestas condições e durante um período superior a 11 semanas, o aumento de peso de ratos normais submetidos ao tratamento da hipófise era superior ao de animais testemunhas da mesma ninhada e durante o mesmo intervalo de tempo. Aqueles autores mostraram também que no organismo

daqueles animais se verificava um aumento de azoto e água e um decréscimo da quantidade total de lípidos, portanto o quadro característico do crescimento em animais jovens antes de atingirem o patamar das suas curvas de crescimento. Por outro lado, os animais testemunhas apresentavam as transformações características de um aumento de idade, após o fecho das epífises, em particular, um decréscimo relativo de azoto e água e um aumento em gorduras e do teor energético.

Na ausência de provas a favor de uma diminuição da taxa metabólica dos animais assim tratados, Lee e Schaffer concluíram que estes animais obtinham uma menor proporção das suas necessidades energéticas a partir da oxidação dos compostos azotados e uma maior proporção a partir da oxidação das gorduras.

Investigações mais recentes (Marx, Magy, Simpson e Evans, 1942) e usando preparações de hormona do crescimento mais puras, confirmaram uma maior retenção de azoto pelos animais submetidos ao tratamento de preparações da hipófise. Aqueles autores demonstraram também que outras fracções da hipófise tinham pouca influência neste aspecto do metabolismo.

Young (1945) observou uma retenção de azoto em cães tratados por uma preparação de hormona do crescimento bastante impura e verificou que o tecido adicionado sob a influência da hipófise tinha uma composição semelhante à do músculo. Sugeriu que as proteínas e glúcidos eram poupados a expensas dos lípidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Li, Simpson e Evans (1948) que usaram preparações de hormona do crescimento com um elevado grau de pureza. Estudaram a composição do organismo de ratos após tratamento por um período de 14 meses e observaram também uma maior proporção de proteínas e água e um decréscimo dos lípidos.

É geralmente aceite, portanto, que a hormona do crescimento provoca uma retenção de azoto e que esta retenção é acompanhada de uma maior deposição de proteínas nos tecidos. Sendo, no entanto, o teor em proteínas num determinado instante, dependente de um equilíbrio entre os processos sintéticos e degradativos, aqueles resultados tanto podem reflectir o efeito de uma estimulação dos processos anabólicos como uma inibição dos processos catabólicos das proteínas.

Os resultados obtidos por Russell e Capiello (1949) são a favor da primeira daquelas hipóteses. Aqueles autores injectaram hidrolisados de caseína em ratos nefrectomizados e estudaram os efeitos da hormona do crescimento na formação da ureia. Uma hora após a administração da caseína, observaram uma redução de 40 % na taxa de

formação da ureia e um aumento na velocidade com que os aminoácidos eram removidos do sangue.

Hoberman (1950) estudou o efeito da hormona do crescimento no metabolismo da glicina marcada com azoto 15 em ratos. Verificou que a redução na excreção de azoto total sob a influência da hormona era acompanhada de uma redução proporcional na excreção do isótopo empregado. Parece portanto não se verificar, nas condições em que estas experiências foram realizadas, qualquer alteração na contribuição do azoto não marcado do organismo para os produtos finais do catabolismo das proteínas.

Trabalhando com ratos normais, Friedberg e Greenberg (1948) verificaram que a incorporação de metionina marcada com enxofre-35 nas proteínas do tecido muscular era aumentada pela administração da hormona do crescimento, e concluíram que o efeito da hormona se faz sentir de preferência na síntese das proteínas.

2.5 — A hormona do crescimento e o metabolismo dos lípidos

2.5.1 — *A mobilização de gordura e os processos catabólicos*

Que extractos da hipófise anterior afectam o metabolismo dos lípidos foi posto em evidência há cerca de 40 anos por Coope e Chamberlain (1925), que observaram uma grande semelhança entre o quadro clínico de certas perturbações da hipófise e certas anomalias do metabolismo dos lípidos.

Injectando ratos e coelhos com uma preparação comercial impura da hipófise, observaram um aumento de ácidos gordos no fígado. Cinco anos mais tarde, Burn e Ling (1930) observaram um efeito cetogénico da hormona. Após injeção de um extracto da hipófise em ratos alimentados à base de manteiga, a produção de corpos cetónicos era consideravelmente aumentada. Este efeito cetogénico da hormona do crescimento, assim como a infiltração de gordura no fígado, foi mais tarde estudado por Best e Campbell (1936) que notaram diferenças quantitativas em várias espécies animais (1938). Embora a quantidade de gordura do fígado aumentasse em consequência do tratamento pela hormona, a quantidade total de gordura do organismo era

reduzida, e aqueles autores explicaram o facto em termos de uma mobilização de gordura do organismo para o fígado, associada a um acréscimo da oxidação.

Mais tarde, Campbell e Lucas (1951) verificaram que o decréscimo dos lípidos do organismo e a mobilização para o fígado afectava principalmente a fracção dos glicéridos.

Young (1945) comparou o crescimento de ratos normais com o de animais submetidos ao tratamento da hipófise. Os animais testemunhas e um dos 2 grupos de animais tratados foram mantidos numa ração constante, ajustada de modo a manter o peso dos animais constante antes do início do tratamento pela hipófise, enquanto que o outro grupo foi alimentado «ad libitum» e os 3 grupos de animais observados durante 60 dias. Durante as primeiras 3 semanas o comportamento destes dois grupos de animais foi sensivelmente o mesmo, mas após este período inicial o crescimento dos animais mantidos numa ração limitada começou a declinar, acabando por atingir um patamar. Ao fim de 60 dias o aumento de peso dos animais tratados e submetidos a uma alimentação limitada era cerca de 37 %, enquanto que o dos animais com livre acesso aos alimentos era cerca de 60 %.

Greenbaum (1953), que repetiu aquelas experiências, sugeriu que o declínio observado no crescimento, no caso dos animais mantidos numa ração limitada, era devido, não ao desenvolvimento de uma resistência natural ao tratamento, mas ao esgotamento de algum material endógeno necessário para a manutenção do crescimento. Verificou que o fim do crescimento era atingido quando as gorduras de reserva do organismo eram reduzidas a 50 % do valor inicial.

Este facto permitia explicar os resultados obtidos por Gaebler (1933) que verificou que a curva de crescimento de cães submetidos ao tratamento da hormona do crescimento atingia um patamar ao fim de 3 meses; uma interrupção do tratamento por um período de 2 meses, seguida de novo tratamento pela hormona, conduziam a um recomeço do crescimento.

Medições dos cocientes respiratórios mostraram que, enquanto os animais testemunhas tinham um cociente respiratório 0,85-0,90, isto é, um valor característico de um metabolismo à base de proteínas, gorduras e glúcidos, o dos animais tratados pela hormona era apenas 0,72, portanto característico de um metabolismo inteiramente à base de gordura. Análises da carcassa revelaram um aumento contínuo de proteína nos animais tratados, assim como um decréscimo progressivo

dos lípidos. No entanto, a gordura catabolizada pelo grupo de animais em regime de alimentação não limitada tinha uma origem essencialmente dietética, enquanto que a usada pelos animais recebendo uma ração diária limitada provinha em grande parte das reservas de gordura do organismo. Estes factos levaram Greenbaum (1953) a concluir que, no primeiro caso, a energia proveniente da alimentação permite manter um crescimento contínuo enquanto que, no segundo, as reservas do organismo são a pouco e pouco esgotadas, atingindo-se finalmente um estado em que todos os componentes dietéticos são mobilizados, a fim de fornecer a energia necessária para a manutenção, e como consequência, o crescimento cessa.

Um dos efeitos bem conhecidos das injeções de hormona do crescimento é o aparecimento de grandes quantidades de gordura no fígado dos animais injectados.

Barrett, Best e Ridout (1938) alimentaram ratos, submetidos ao tratamento da hipófise, com gordura marcada com deutério e concluíram que os lípidos acumulados no fígado provinham das reservas do organismo. Estes resultados foram confirmados mais tarde por Stetten e Salcedo (1944).

Greenbaum e McLean (1953 a) estudaram a distribuição dos lípidos no fígado e plasma sanguíneo de ratas adultas, tratadas por uma preparação cristalina de hormona do crescimento, a intervalos de tempo variáveis. Verificaram que o máximo da mobilização para o fígado ocorria 6 horas após o início do tratamento e que só após um período de 24 horas a quantidade de gordura do fígado voltava ao normal. Observaram também que aquela mobilização afectava principalmente a fracção dos lípidos neutros cujo máximo era atingido ao fim de 3 horas. A situação no plasma sanguíneo era um pouco diferente, sendo o máximo correspondente aos lípidos neutros atingido ao fim de 6 horas, que era também o intervalo de tempo ao fim do qual os fosfolípidos do fígado atingiam o seu máximo. Em face destes resultados, aqueles autores sugeriram que, numa altura em que a mobilização de gordura para o fígado está ainda em progresso, aquele órgão está sintetizando fosfolípidos a partir dos lípidos neutros a uma velocidade superior ao normal, e uma grande parte destes fosfolípidos assim formados é libertada no plasma sanguíneo. Tanto a infiltração anormal de gordura no fígado durante as primeiras 6 horas do tratamento, como o seu desaparecimento nas 18 horas seguintes, associados a um aumento de corpos cetónicos no sangue e urina (Bennett, Kreiss, Li

e Evans, 1948) são indicativos de um elevado catabolismo dos lípidos durante aquele intervalo de tempo.

Greenbaum e McLean (1953 a) estudaram o efeito da hormona do crescimento no sistema oxidativo dos ácidos gordos e na produção de acetacetato. O método usado permitia-lhes calcular separadamente a oxidação dos ácidos gordos e a actividade do ciclo de Krebs. A partir dos resultados obtidos calcularam a taxa de degradação dos ácidos gordos até ao estado de unidades com 2 átomos de carbono e a velocidade com que estas unidades eram transformadas em anidrido carbónico e água.

Ao fim de 6 horas observaram um decréscimo pronunciado no consumo de oxigénio usado no catabolismo dos lípidos e uma inibição da produção de acetacetato, mas ao fim de 12 horas, o oxigénio consumido na oxidação dos lípidos tinha já ultrapassado o valor normal e a produção de acetacetato era estimulada. Observaram também que o sistema oxidativo dos ácidos gordos assim como o das unidades com 2 átomos de carbono eram inibidos ao fim de 6 horas de tratamento pela hormona.

Ao fim de 12 horas, tanto a transformação dos ácidos gordos em fragmentos bicarbonados como a produção de acetacetato tinham voltado ao normal, mas a actividade do ciclo de Krebs era fortemente estimulada e daí o aumento no consumo total de oxigénio.

Ao fim de 24 horas o quadro tinha mudado radicalmente, e os fragmentos bicarbonados eram canalizados no sentido da produção de acetacetato, em vez de serem oxidados por intermédio do ciclo de Krebs. Em face destes resultados, aqueles autores sugeriram que a hormona do crescimento desempenha um papel vital quanto ao destino dos fragmentos bicarbonados produzidos a partir dos ácidos gordos. Mostraram também que nestes tratamentos de curto prazo, a quantidade de corpos cetónicos encontrados na urina é muito menor do que seria de esperar em face do grande aumento na produção de acetacetato pelo fígado. Parece portanto provável que o acetacetato formado seja oxidado em larga escala nos tecidos extrahepáticos, como tinha sido sugerido por Harrison e Long (1940) e Stadie (1945). Os resultados obtidos por aqueles autores parecem indicar que a resposta do fígado ao tratamento pela hormona é bastante rápida, mas que o efeito é de curto prazo, e que os efeitos de longo prazo na estimulação do catabolismo dos lípidos têm lugar nos tecidos extrahepáticos.

2.5.2 — *Processos anabólicos*

O efeito da hormona do crescimento na biosíntese dos lípidos tem sido estudado principalmente com o auxílio de compostos marcados. Welt e Wilhelmi (1950) injectaram óxido de deutério em ratos e observaram uma menor incorporação do deutério nos lípidos do fígado e da carcassa dos animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento, o que indicava uma redução da lipogénese.

Experiências *in vitro* usando carbono 14 como marcador da molécula dos lípidos têm conduzido a resultados semelhantes. Perry e Bowen (1955) administraram hormona do crescimento a ratos normais e observaram uma redução na incorporação do acetato-2-C¹⁴, adicionado *in vitro*, nos ácidos gordos de fatias de fígado.

Este efeito inibidor da hormona do crescimento na incorporação do acetato nos lípidos, tem sido observado mesmo em animais supra-renalectomizados (Gurin e Brady, 1953; Perry e Bowen, 1955), o que parece indicar que as hormonas suprarenais não desempenham um papel essencial na acção inibidora da hormona do crescimento na formação dos lípidos.

Experiências *in vitro* usando acetato marcado com carbono 14 mostraram que a incorporação daquele precursor dos lípidos nos ácidos gordos de fatias de fígado de gatos e ratos é reduzida pela pancreatômia e aumentada pela hipofisectomia (Brady, Lukens e Gurin, 1951; Gurin e Brady, 1953).

Estes autores verificaram também que a incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos lípidos de fatias de fígado de gatos não é afectada pela remoção simultânea do pâncreas e da hipófise. Animais nestas condições, no entanto, quando injectados com a hormona do crescimento, perdem parte da capacidade para incorporar acetato nos lípidos de fatias de fígado (Brady e colaboradores, 1951; Gurin e colaboradores, 1953). Isto mostra que é possível demonstrar uma acção inibidora da hormona do crescimento mesmo na ausência de insulina.

A adição de insulina *in vitro* a um meio incubador contendo fatias de fígado de animais normais estimula a lipogénese a partir do acetato marcado com carbono 14 (Brady, Lukens e Gurin, 1951; Chaikoff, 1951-52; Gurin e Brady, 1953). Se as fatias forem preincubadas durante 1-2 minutos com hormona do crescimento antes da adição de insulina, esta já não estimula a lipogénese (Brady e colaboradores,

1951). Estes autores mostraram também que a hormona do crescimento, adicionada *in vitro*, não inibe a lipogénese em fatias hepáticas.

Greenbaum (1955) comparou o metabolismo do piruvato-2-C¹⁴, adicionado *in vitro* a fatias de fígado de ratos, e verificou que o tratamento pela hormona reduzia grandemente a taxa de formação dos ácidos gordos a partir daquele precursor.

Os resultados obtidos por Allen, Medes e Weinhouse (1956), no entanto, não confirmam aqueles resultados. Estes últimos autores estudaram o efeito da hormona do crescimento na incorporação do acetato marcado com carbono 14, *in vitro*, nos ácidos gordos do fígado de ratos. Das 5 experiências citadas por aqueles autores, 4 conduziram a uma inibição da síntese dos ácidos gordos a partir do acetato marcado, e uma a uma estimulação daquela síntese, sendo a máxima inibição observada apenas de 38 %. Estes resultados variáveis levaram Allen e colaboradores a concluir que o efeito da hormona do crescimento na inibição da síntese dos ácidos gordos não estava devidamente estabelecido.

Contudo, os dois conjuntos de experiências diferiam em alguns aspectos. Os animais usados por Allen tinham sido privados de alimentação durante 24 horas e de novo alimentados por igual período de tempo antes de serem sacrificados. Embora nenhuma justificação tenha sido dada para este procedimento, é possível que o tratamento a que foram submetidos os animais, antes de serem sacrificados, introduza certas variáveis que tornem aqueles resultados não directamente comparáveis com os de outros autores (Greenbaum e Glascock, 1957).

Mais recentemente, Winegrad, Shaw, Lukens, Stadie e Renold (1959) estudaram o efeito da hormona do crescimento e da insulina, adicionadas *in vitro*, no metabolismo da glucose no tecido adiposo de ratos normais e tornados diabéticos pela aloxana. Em ratos normais, a hormona do crescimento provoca um aumento na incorporação da glucose uniformemente marcada com carbono 14 na fracção total extraída pelo éter do petróleo e na produção de anidrido carbónico. Em contrapartida, observaram uma redução na incorporação daquele precursor na fracção dos ácidos gordos obtidos por saponificação do material solúvel no éter do petróleo. Aquelles autores observaram também que a incorporação da glucose uniformemente marcada com carbono 14 nos ácidos gordos do tecido adiposo, na presença simultânea de hormona do crescimento e insulina, excede grandemente a incorporação daquele precursor quando apenas a primeira daquelas hormonas está presente.

Nos ratos tornados diabéticos pela aloxana, aqueles autores verificaram que a adição de hormona do crescimento provoca um aumento na produção de anidrido carbónico a partir da glucose uniformemente marcada, mas não estimula a incorporação daquele precursor nos ácidos gordos, ao contrário do que sucede com a insulina (Winegrad e Renold, 1958).

Greenbaum e Glascock (1957) estudaram a incorporação do piruvato-2-C¹⁴ e acetato-1-C¹⁴ nos lípidos de fatias de fígado de ratos normais e injectados pela hormona do crescimento, e a produção de anidrido carbónico a partir daqueles substratos e do piruvato-1-C¹⁴. Observaram que a hormona não exerce qualquer efeito na produção de anidrido carbónico a partir daqueles substratos, mas que provocava uma grande redução na incorporação do piruvato-2-C¹⁴ e do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e na fracção dos ácidos gordos. Verificaram também um aumento na incorporação daqueles precursores no colesterol.

Se a menor incorporação do acetato-1-C¹⁴ e piruvato-2-C¹⁴ nos fosfolípidos de fatias hepáticas de animais submetidos ao tratamento da hormona, corresponde a uma verdadeira inibição da síntese daqueles compostos, não é fácil conciliar aqueles resultados com os de Greenbaum, Graymore e Slater (1957). Estes últimos autores injectaram ortofosfato marcado com fósforo 32 em ratos e compararam a incorporação daquele elemento nos fosfolípidos do fígado de animais normais e submetidos ao tratamento da hormona do crescimento. Verificaram que a hormona provocava não só um aumento na incorporação do fósforo 32 nos fosfolípidos, mas também um aumento na quantidade total de fosfolípidos do fígado.

As diferentes respostas obtidas com o acetato-1-C¹⁴ e ortofosfato-P³² levaram Greenbaum, Graymore e Slater (1957) a sugerir que a hormona do crescimento possa afectar o «turnover» das diferentes partes que constituem a molécula do fosfolípido em sentidos opostos.

3 — PARTE EXPERIMENTAL

3.1 — Materiais e métodos

3.1.1 — Animais e reagentes

Os animais usados em todas as experiências foram ratas adultas virgens «Hooded Norway» de 4 a 6 meses de idade e cujo peso oscilava entre 180 e 200 gramas. Estes animais foram mantidos desde o nascimento na mesma dieta (dieta 41 de Bruce e Parkes, 1946) cujo teor em proteínas, gorduras e glúcidos era 13,7 %, 3,5 % e 49 % respectivamente. Nas experiências sobre o metabolismo dos lípidos, os animais foram injectados intraperitonealmente com 1 miligrama de hormona do crescimento em 1 mililitro de água e sacrificados por secção da medula cervical 6 horas após administração da hormona.

Com o objectivo de reduzir ao mínimo a variação biológica, tão importante em trabalhos deste género, em cada experiência foram usados animais do mesmo sexo (fêmeas), da mesma ninhada e aproximadamente com o mesmo peso.

Os reagentes usados no presente trabalho foram produtos «Analar» da British Drug Houses Ltd.

Acetato-1-C¹⁴, Palmitato-1-C¹⁴, Glicina-2-C¹⁴, Glicerol-1-C¹⁴, Ácido mevalónico-2-C¹⁴ e ortofosfato-P³² foram fornecidos pelo Radiochemical Centre de Amersham. O ácido palmítico marcado com carbono 14 foi-nos fornecido em solução benzénica e exigia portanto um tratamento prévio antes de poder ser adicionado ao meio incubador. O solvente foi removido por evaporação à temperatura ambiente e sob corrente de azoto, o resíduo foi dissolvido a quente numa solução muito diluída de soda cáustica e o volume ajustado de modo que a concentração final da solução fosse 10 microcuries por mililitro. A solução de palmitato de sódio assim preparada, ao arrefecer, apresenta-se na

forma de um gel, e por isso, antes de ser usada, foi aquecida para formar uma solução homogênea.

A acetona usada na precipitação dos fosfolípidos foi bidestilada sobre cloreto de cálcio anidro.

3.1.2 — *Preparação da hormona do crescimento*

A hormona do crescimento usada no presente trabalho foi preparada essencialmente pelo método descrito por Wilhelmi (1955). No entanto, para evitar possíveis contaminações por hormonas do lobo posterior da hipófise, apenas o lobo anterior foi usado nas operações de extracção.

Em cada preparação foram usadas cerca de 300 hipófises de vacas que nos foram fornecidas em recipientes contendo anidrido carbónico sólido.

As glândulas foram abertas segundo um corte longitudinal e os lobos anteriores foram separados dos posteriores, que foram desprezados. Os lobos anteriores foram misturados com anidrido carbónico sólido e o conjunto foi moído numa máquina de moer carne. Esta operação foi repetida 3 vezes, usando de cada vez discos com orifícios sucessivamente menores. O pó obtido foi colocado numa cápsula de porcelana de grande diâmetro e o anidrido carbónico deixado evaporar.

Quando a temperatura atingiu 0° C, o conjunto foi transferido para um quarto frigorífico cuja temperatura era mantida entre 1 e 3 graus centrígrados e onde se efectuaram todas as operações de extracção e purificação.

O conjunto foi lançado num recipiente de vidro contendo 2 litros de uma solução 0,3 molar de cloreto de potássio a 1° C, o pH foi ajustado para 5,5 pela adição de uma solução diluída de hidróxido de potássio a baixa temperatura e a mistura agitada mecanicamente com o auxílio de um agitador de vidro ligado a um motor eléctrico. Manteve-se a agitação durante a noite e na manhã seguinte o conjunto foi centrifugado em centrífuga refrigerada. A fase sólida foi desprezada e o pH da solução sobrenadante foi ajustado para 8,5 pela adição de uma solução diluída de hidróxido de potássio. Adicionou-se etanol a 95 %, gota a gota, tendo o cuidado de suspender a adição sempre

que a temperatura mostrava tendência a subir. Deu-se por finda a adição de álcool quando a concentração final da mistura era 10 % em etanol. O conjunto foi então centrifugado em centrífuga refrigerada e o precipitado desprezado.

Ao sobrenadante foi adicionado etanol a 95 %, gota a gota, até que a concentração final da mistura fosse 30 % em etanol. O precipitado que se forma contém a maior parte da hormona do crescimento do extracto original, mas é ainda uma preparação bastante impura. O precipitado foi dissolvido em 500 ml de uma solução gelada 0,1 molar de cloreto de potássio, cujo pH tinha sido ajustado para 11 pela adição de umas gotas de uma solução diluída de hidróxido de potássio.

Retirou-se 1 ml que se passou para um balão de 100 ml, perfazendo-se o volume com a mesma solução de cloreto de potássio. A quantidade total de proteína foi calculada num alíquota desta solução pelo método de Warburg e Christian (1942) determinando ao espectrofotómetro as densidades ópticas a 260 e 280 m μ .

Partindo de 450 gramas de lobos anteriores da hipófise obtiveram-se, nesta altura, 32 gramas de proteína.

Foi adicionada mais solução de cloreto de potássio 0,1 molar, a pH 11, de modo que a concentração final em proteína fosse 1 %. O pH da solução foi ajustado para 4,8 e o precipitado que se formou foi separado por centrifugação. A solução sobrenadante foi guardada à parte e o precipitado foi redissolvido, a pH 11, em metade do volume anterior da solução de cloreto de potássio 0,1 molar. O pH foi de novo ajustado para 4,8 e o conjunto centrifugado; a parte sólida foi desprezada, o sobrenadante misturado com o sobrenadante da operação anterior e o pH da solução assim obtida foi ajustado para 8,5 pela adição de umas gotas de uma solução diluída de hidróxido de potássio. Etanol a 95 % foi adicionado gota a gota, até que a concentração final da mistura em etanol fosse 25 %, mantendo durante a operação a agitação mecânica.

O precipitado obtido, geralmente com uma leve cor rósea, foi separado por centrifugação.

A determinação da quantidade total de proteína pelo método de Warburg e Christian (1942) mostrou que nesta altura se obteve cerca de 2 gramas de proteína. O precipitado foi dissolvido em água, a pH 11, e o volume ajustado de modo que a concentração em proteína fosse 0,5 %. Algum material insolúvel foi removido por centrifugação. O pH foi então levado a 3,5 pela adição de umas gotas de uma solução

diluída de ácido clorídrico, apresentando-se a solução a este pH com um aspecto límpido e transparente. O pH foi, pouco a pouco, tornado alcalino pela adição de uma solução diluída de hidróxido de potássio, gota a gota. Todos os precipitados que se formaram foram removidos por centrifugação. Correndo assim a escada de pH de 3,5 a 11, por décimos, obtivemos precipitados a pH 5,5, 6,1 e 7,2, róseo o primeiro e brancos os dois últimos. O pH foi de novo levado a 3,5 e a operação anterior repetida. O pH foi finalmente ajustado para 8,5 e etanol a 95 % foi adicionado, gota a gota, até que a concentração final em etanol fosse 20 %, mantendo durante a operação a agitação mecânica.

O precipitado branco, que se formou, foi separado por centrifugação, suspenso em 40 ml de água e liofilizado.

Partindo de 300 lobos anteriores de hipófises obtivemos, em média, nas diversas preparações, 350 mg de hormona do crescimento.

3.1.3 — *Verificação da actividade das preparações de hormona do crescimento*

As actividades das preparações de hormona do crescimento, preparadas como atrás ficou descrito, foram verificadas pelo teste do crescimento. 9 ratas adultas foram separadas em 3 grupos de 3 (grupos A, B, e C) que foram colocados em gaiolas separadas, com livre acesso a comida e água. Estes animais foram pesados diariamente e à mesma hora, durante 7 dias, com o objectivo de nos certificarmos que tinham atingido o patamar das suas curvas de crescimento, após o que foram submetidos ao tratamento seguinte:

Os animais do grupo A foram injectados diariamente com 0,5 mg de hormona do crescimento em 0,5 ml de água, subcutâneamente, os do grupo B com 0,2 mg em 0,5 ml de água e os do grupo C (grupo testemunha) com 0,5 ml de água. A pesagem e o tratamento diários foram mantidos durante 5 dias. Os resultados obtidos encontram-se no quadro I. Pode ver-se que, ao fim do tempo indicado, os animais do grupo C mantiveram um peso aproximadamente constante, enquanto que os do grupo A e B aumentaram, em média, 11,3 e 5,3 gramas respectivamente.

Consideramos estes valores como indicativos de uma actividade de crescimento bastante razoável. No entanto, das 5 amostras de hormona do crescimento que preparámos, apenas 3 mostraram uma

actividade de crescimento igual ou superior à expressa por aqueles valores. As outras duas, por mostrarem uma actividade de crescimento menor, não foram usadas nas experiências sobre o metabolismo dos lípidos.

É possível que a menor actividade de crescimento revelada pelas duas preparações que não foram usadas, seja devida a demoras na extracção das hipófises, após a morte dos animais, operação efectuada no matadouro e que não foi por nós controlada.

QUADRO I

Verificação da actividade da hormona do crescimento

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
	0,5 mg diários	0,2 mg diários	0,5 ml de água
Peso dos animais (g) ...	206 193 189	177 173 180	179 170 172
	206 196 191	177 173 182	180 168 173
	210 201 197	179 176 183	180 169 174
	214 206 199	182 175 184	181 167 173
	218 204 200	185 176 185	182 167 172
Varição global de peso	+12 +11 +11	+8 +3 +5	+3 -3 0
Varição média do grupo	+11,3	+5,3	0

3.1.4 — *Preparação da fosforilcolina marcada com fósforo 32*

A fosforilcolina foi preparada essencialmente pelo método de Plimmer e Burch (1937) tendo em atenção as modificações introdu-

zidas por Riley (1944) no caso de o composto ser marcado com fósforo 32.

Uma solução de ortofosfato de sódio, marcado com fósforo 32, em 3 ml de água e contendo 150 microcuries daquele elemento radioactivo foi transferida para um tubo largo de vidro de paredes grossas e adicionada de 0,1 ml de ácido ortofosfórico. O conjunto foi colocado num banho de óleo, mantido entre 165° e 175°, e a água removida por evaporação. Durante a operação fez-se passar através do tubo, mas sem borbulhar na solução, uma corrente de azoto. Completada a evaporação da água foram adicionados 220 mg de cloreto de colina seco e adaptada ao tubo uma tampa de vidro contendo suspenso, mas sem tocar nos reagentes, um pequeno recipiente em vidro com pentóxido de fósforo. Uma pequena abertura na tampa do tubo permitia ligá-lo a uma trompa de água e manter assim uma pressão reduzida. O tubo foi mantido no banho de óleo entre 165° e 175° e sob vácuo durante 10 horas, ao fim das quais foi deixado arrefecer e adicionados alguns mililitros de água e 100 mg de cloreto de cálcio. A solução foi neutralizada pela adição de uma solução saturada de hidróxido de cálcio, usando fenolftaleína como indicador, e o fosfato de cálcio formado foi removido por centrifugação. Após redução do volume a cerca de 3 ml por aquecimento, o carbonato de cálcio que precipitou foi separado por centrifugação e à solução foi adicionado um volume igual de etanol que precipitou o sal de cálcio da fosforilcolina. Este foi separado por centrifugação, lavado sucessivamente com etanol a 60 %, 80 % e finalmente com álcool absoluto. O precipitado foi redissolvido num pequeno volume de água, reprecipitado pela adição de um volume igual de etanol, separado por centrifugação, lavado sucessivamente com álcool a 60 %, 80 % e álcool absoluto e dissolvido num pequeno volume de água.

Sendo o ião cálcio um inibidor do sistema enzimático que catalisa a incorporação da fosforilcolina na lecitina (Kennedy e Weiss, 1956; Rodbell e Hanahan, 1955; Weiss, Smith e Kennedy, 1958), fez-se passar a solução aquosa do sal de cálcio da fosforilcolina através de uma coluna contendo a resina permutadora de catiões IR-100, na forma de ião potássio, com o fim de remover aquele ião perturbador.

A fosforilcolina-P³², assim preparada, tinha uma actividade específica 33 700 impulsos por minuto por micromole, medida num contador sem janela Tracerlab SC-16.

3.1.5 — *Preparação dos ácidos fosfatídicos*

Os ácidos fosfatídicos foram preparados a partir da lecitina que por sua vez foi preparada a partir de gemas de ovos de galinha.

Foram usadas as gemas de 6 ovos que foram submetidas ao seguinte tratamento (Hanahan, Turner e Jayko, 1951): as gemas foram misturadas com 2 volumes de acetona num homogeneizador tipo Waring. A mistura foi deixada assentar durante 3 horas ao fim das quais foi filtrada e guardado o filtrado. O resíduo foi extraído novamente com 1 volume de álcool etílico a 95 % e a solução misturada com a anterior solução cetónica. A mistura resultante foi reduzida a um pequeno volume por evaporação a 45° e a pressão reduzida, tendo o cuidado de fazer borbulhar uma corrente de azoto durante a operação.

A fracção resultante foi extraída duas vezes pelo éter do petróleo, combinadas as duas fracções obtidas e reduzido o volume a pressão reduzida sob uma corrente de azoto. Após a adição de 4 volumes de acetona, o precipitado resultante foi removido por centrifugação, suspenso em acetona e centrifugado. Esta operação de lavagem pela acetona foi repetida 8 vezes. o precipitado foi dissolvido em éter do petróleo e de novo precipitado pela acetona. Separado o precipitado por centrifugação, foi de novo suspenso em acetona e a operação de lavagem repetida mais 5 vezes. Finalmente o precipitado foi dissolvido em álcool etílico a 95 % e todo o material insolúvel foi removido por centrifugação. Esta lecitina, assim preparada, contém ainda algumas impurezas, principalmente carotenos, sendo necessária nova purificação desta vez por cromatografia em coluna de alumina.

Uma solução de lecitina a 3 % em etanol a 95 % foi aplicada a uma coluna de alumina de cerca de 70 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro, tendo na parte superior um reservatório de cerca de 500 ml de capacidade, contendo etanol a 95 %. Foram recolhidas fracções de 50 ml que foram analisadas para o fósforo e colina, com o objectivo de aproveitar as fracções em que a razão daqueles compostos fosse mais próxima da unidade.

O fósforo foi determinado pelo método colorimétrico de King (1932) e a colina pelo método de Glick (1944). Os resultados da análise das várias fracções eluídas constam do quadro II.

Uma alíquota da solução de lecitina em etanol foi transferida para um homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem e o dissolvente removido por evaporação sob corrente de azoto. Após adição

de 30 ml de tampão acetato de pH 5,7, foi preparada uma suspensão a 5 % por homogeneização. Os ácidos fosfatídicos foram preparados a partir desta suspensão de lecitina pelo método de Kates (1955) por incubação em presença de uma lecitinase existente nos cloroplastos de cenoura e que catalisa o desdobramento da molécula de lecitina em ácido fosfatídico e colina.

Cerca de 200 gramas de cenouras frescas foram lavadas, reduzidas a fatias finas e homogeneizadas em 150 ml de água a 4° num homogeneizador do tipo Waring rodeado de gelo. A pasta resultante

QUADRO II

Análise do fósforo e colina nas frações obtidas na purificação da lecitina em coluna de alumina

Fração	Volume	Fósforo μmoles/ml	Colina μmoles/ml
1	30 ml	0	0
2	50 ml	0	0
3	50 ml	2,46	2,66
4	50 ml	33,9	35,1
5	50 ml	15,5	16,0
6	50 ml	5,8	5,6
7	50 ml	3,7	3,4
8	50 ml	1,9	2,0
9	50 ml	1,1	1,2
10	50 ml	0,74	0,96
11	50 ml	0,4	—

foi passada através de uma gase fina e o suco centrifugado em centrífuga refrigerada durante 2 minutos a 1 800 G; o sobrenadante foi de novo centrifugado, desta vez a 15 000 G durante 20 minutos, e o sedimento, de cor alaranjada, depositado a esta velocidade de centrifu-

gação, foi lavado com água a 4°, de novo depositado por centrifugação a 15 000 G e finalmente suspenso em água, de modo que cada mililitro da suspensão contivesse cerca de 20 mg de cloroplastos.

30 ml da suspensão de lecitina em tampão acetato de pH 5,7 foram adicionados de 30 ml da suspensão de cloroplastos em água e 30 ml de éter etílico, o conjunto agitado vigorosamente e incubado a 25° durante duas horas em termostato com agitação mecânica.

Terminada a incubação, foram adicionados 15 ml de ácido perclórico 0,8 N, o conjunto filtrado através de algodão e o resíduo lavado com éter em quantidade tal que o filtrado ocupasse o volume total de 150 ml. A fase etérea foi separada em funil de decantação, lavada 5 vezes com água e o volume reduzido a 5 ml por evaporação sob corrente de azoto. Foram adicionados 20 ml de etanol a 99 % e o conjunto deixado no frigorífico a 5° durante trinta minutos, ao fim dos quais o conjunto foi centrifugado, o resíduo desprezado e o sobrenadante neutralizado pela adição de solução alcoólica de hidróxido de sódio 0,5 N. O precipitado formado foi separado por centrifugação, lavado com uma mistura etanol-éter (4:1) e finalmente com álcool etílico a 99 %. O precipitado foi dissolvido em 4 ml de éter e os ácidos fosfatídicos de novo precipitados pela adição de 2 volumes de acetona e separados por centrifugação. O precipitado foi lavado 2 vezes com acetona e finalmente seco no vácuo.

3.1.6 — *Preparação e incubação das fatias hepáticas*

Seis horas após injeção da hormona (1 mg em 1 ml de água) os animais foram sacrificados por secção da medula cervical e os fígados rapidamente removidos e colocados num gobelé rodeado de gelo e contendo solução bicarbonato de Krebs-Ringer, previamente gasificada com uma mistura gasosa de 95 % de oxigénio e 5 % de anidrido carbónico.

O fígado foi então colocado sobre um papel de filtro embebido da mesma solução de Krebs-Ringer, e cortado em pequenos fragmentos de cerca de 1 cm² de área, que foram rapidamente transferidos para um outro gobelé contendo solução de Krebs-Ringer a baixa temperatura e rodeado de gelo. Os fragmentos de fígado foram depois reduzidos a fatias muito finas de cerca de 0,3 mm de espessura e 1 cm² de área num aparelho do tipo Stadie-Riggs (1944).

As fatias, assim preparadas, foram rapidamente pesadas numa balança de torsão e transferidas para erlenmeyers de 100 ml contendo 5 ml de solução bicarbonato de Krebs-Ringer e alguns microcuries do composto marcado usado como precursor dos lípidos. Cada erlenmeyer continha fatias hepáticas num total de 400 mg. A preparação das fatias para a incubação foi efectuada com a máxima rapidez possível de modo que entre a morte do animal e o início da incubação não decorresse mais de 15 minutos.

Aos erlenmeyers foram adaptadas rolhas de borracha atravessadas por 2 tubos de vidro e o conjunto transferido para um termostato com agitação mecânica, cuja temperatura foi mantida a $37^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$. Durante os primeiros 20 minutos de incubação fez-se passar através dos erlenmeyers uma mistura gasosa constituída por 95 % de oxigénio e 5 % de anidrido carbónico, ao fim dos quais os frascos foram fechados e a incubação continuada por mais duas horas e quarenta minutos.

Com o fim de aumentar a segurança estatística, em cada experiência foram trabalhadas simultâneamente 2 amostras de cada fígado e os resultados apresentados nos quadros que se seguem são médias aritméticas de 2 valores.

3.1.7 — *Extracção e purificação dos fosfolípidos e lípidos neutros*

Terminada a incubação, os conteúdos dos erlenmeyers foram transferidos para tubos de centrífuga de 10 ml, o conjunto centrifugado e a solução sobrenadante desprezada. As fatias foram suspensas numa solução fria de cloreto de sódio a 0,9 %, com o auxílio de uma vareta de vidro, e o conjunto de novo centrifugado; a solução sobrenadante foi desprezada, as fatias suspensas numa solução fria a 5 % de ácido tricloroacético a baixa temperatura e o conjunto transferido para um homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem (1936) onde foi homogeneizado.

A fase líquida foi separada por centrifugação e desprezada, e a fase sólida foi de novo suspensa numa solução gelada de ácido tricloroacético a 5 %. Após centrifugação, a fase líquida foi desprezada e o resíduo suspenso em 1 ml de água, adicionados 4 ml de etanol e o

conjunto agitado com vareta de vidro e deixado naquela mistura durante a noite.

No dia seguinte a fase líquida foi separada por centrifugação e transferida para um gobelé de 100 ml. O resíduo foi extraído mais uma vez com etanol, duas vezes com a mistura etanol-éter (3:1) e finalmente com éter, empregando de cada vez 5 ml de solvente.

Os extractos foram reunidos no mesmo gobelé e o dissolvente evaporado à temperatura ambiente com o auxílio de um secador de cabelo.

O resíduo foi extraído 3 vezes pelo éter do petróleo (p. eb. 40°), usando de cada vez 4 ml daquele solvente, e os extractos reunidos num tubo de centrifuga. O volume da solução de éter do petróleo foi reduzido a 1 ml por evaporação e os fosfolípidos precipitados pela adição de 8 ml de acetona fria.

Para tornar a precipitação dos fosfolípidos mais completa foram adicionadas 4 gotas de uma solução a 4 % de cloreto de magnésio em etanol.

O conjunto foi colocado no frigorífico durante 30 minutos, ao fim dos quais o precipitado de fosfolípidos foi separado por centrifugação e a solução sobrenadante, contendo os lípidos neutros (*), foi guardada à parte. Os fosfolípidos foram redissolvidos em 1 ml de clorofórmio e de novo precipitados pela adição de 8 ml de acetona fria e algumas gotas de uma solução de cloreto de magnésio em etanol. O precipitado foi deixado assentar no frigorífico durante 30 minutos, ao fim dos quais o conjunto foi centrifugado, o sobrenadante misturado com o sobrenadante da operação anterior e o precipitado de fosfolípidos seco em excicador contendo cloreto de cálcio anidro.

A solução cetónica contendo os lípidos neutros foi evaporada à secura à temperatura ambiente e com o auxílio de um secador de cabelo. O resíduo foi dissolvido em 10 ml de éter do petróleo (p. eb. 40°) e a solução transferida para um funil de decantação, onde foi agitada com água com o auxílio de uma vareta de vidro dobrada em ângulo recto e ligada a um motor eléctrico. A lavagem da solução dos lípidos neutros foi repetida mais duas vezes.

(*) A fracção a que chamamos «lípidos neutros» é constituída pelo conjunto de compostos que permanecem em solução cetónica após precipitação dos fosfolípidos.

3.1.8 — *Preparação da amostra radioactiva e medição da radioactividade*

Sendo o carbono 14 um emissor β de muito fraca energia (0,15 Mev) a absorção nas janelas dos tubos Geiger-Muller, usualmente empregadas na medição da radioactividade, e a absorção pela própria amostra assumem uma importância considerável.

Embora se tratasse apenas de comparar radioactividades, o emprego de tubos com janela não se mostrava aconselhável neste caso, visto que a absorção na janela do tubo obrigaria a trabalhar com grandes quantidades iniciais de radioactividade, com possível dano para as células.

Para evitar este inconveniente, usámos um contador sem janela, em que a amostra é colocada no interior do próprio contador, o que se traduz por um grande aumento na eficiência da contagem e permite assim trabalhar com menores doses de radioactividade.

Com o objectivo de minimizar o efeito da absorção na própria amostra tomaram-se certas precauções que passamos a descrever.

Sobre um disco circular de níquel de 1,5 cm de diâmetro foi colocado um círculo de papel de limpar lentes, do mesmo diâmetro, e o conjunto pesado. Alíquotas da solução de fosfolípidos em clorofórmio ou da solução de lípidos neutros em éter do petróleo foram pipetadas nos discos assim preparados e os dissolventes evaporados sob lâmpada de infra-vermelhos. O conjunto foi deixado arrefecer num excicador e de novo pesado.

O uso do disco de papel no fundo do disco revelou-se bastante útil porque permite uma distribuição mais uniforme do material no disco.

As quantidades de lípido colocadas em cada disco nunca foram superiores a 1 miligrama. Nestas condições — camada infinitamente delgada — a absorção na própria amostra pode-se considerar desprezável.

Os discos contendo o material radioactivo foram colocados no interior de um contador sem janela Tracerlab SC-16 ligado a uma escala registadora e a radioactividade medida. As contagens foram repetidas um número suficiente de vezes para se conseguir um erro estatístico inferior a 1 %.

A radioactividade total dos fosfolípidos ou lípidos neutros provenientes de cada frasco incubador foi calculada a partir dos seus pesos e do conhecimento da radioactividade específica.

3.2 — Resultados dos ensaios

3.2.1 — *Incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e lípidos neutros de fatias de fígado de rato*

O efeito da hormona do crescimento na biosíntese dos lípidos no fígado foi estudado com o auxílio da técnica radioactiva, o que nos permite trabalhar com quantidades mínimas dos diversos precursores, e manter-nos portanto dentro das condições fisiológicas.

Nas experiências sobre a incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos lípidos do fígado, 400 mg de fatias hepáticas foram incubadas em 5 ml de solução bicarbonato de Krebs-Ringer, contendo 0,5 microcuries de acetato de sódio marcado com carbono 14 no grupo carboxilo, e a radioactividade dos lípidos isolados foi tomada como uma medida da incorporação daquele precursor nos lípidos.

Os resultados da incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e lípidos neutros de fatias de fígado de ratos normais, são comparados, no quadro III, com os resultados obtidos nas mesmas condições com animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento.

Nas seis experiências efectuadas, os resultados mostram claramente que o fígado de animais submetidos ao tratamento hormonal incorpora menos acetato marcado nos fosfolípidos e lípidos neutros do que o de animais testemunhas, sendo, no entanto, as diferenças mais acentuadas no caso dos fosfolípidos.

Estes resultados confirmam os obtidos por Greenbaum e Glascock (1957) sobre o efeito da hormona do crescimento na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado. As menores reduções na incorporação, obtidas por aqueles autores, no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal, podem ser devidas ao facto de terem trabalhado com preparações de hormona menos activas.

As menores radioactividades encontradas nos lípidos dos animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento têm sido inter-

pretadas por vários autores em termos de uma acção inibidora daquela hormona na biosíntese dos lípidos.

QUADRO III

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e lípidos neutros de fatias de fígado de rato

Experiência	FOSFOLÍPIDOS			LÍPIDOS NEUTROS		
	(Imp./100 seg/frasco)		Razão	(Imp./100 seg/frasco)		Razão
	Animal tratado	Animal testemunha		Animal tratado	Animal testemunha	
I	912	3 600	0,25	5 064	6 178	0,82
II	2 748	7 338	0,37	10 710	15 988	0,67
III	2 148	7 716	0,28	6 445	7 492	0,86
IV	1 524	4 608	0,33	5 639	7 944	0,71
V	1 765	8 435	0,21	4 420	15 472	0,29
VI	849	7 644	0,11	3 192	15 200	0,21

3.2.2 — Efeito da adição de glicerol na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos de fatias de fígado

É sabido (Kennedy, 1953) que a concentração de glicerol livre num determinado tecido animal, pode, em certas condições, ser um factor limitador da síntese dos lípidos.

Se o efeito da hormona do crescimento se fizer sentir, de qualquer modo, sobre a concentração de glicerol livre no fígado, diminuindo-a,

é de esperar que a adição daquele composto ao meio incubador, possa restaurar, pelo menos em parte, a capacidade do fígado para sintetizar lípidos.

Nestas condições, e numa primeira tentativa para localizar o efeito da hormona do crescimento na biosíntese dos lípidos, resolvemos investigar o efeito da adição de glicerol na incorporação de acetato- $1-C^{14}$ nos fosfolípidos de fatias de fígado.

As experiências foram efectuadas como anteriormente, usando como meio incubador solução bicarbonato de Krebs-Ringer, com a diferença que, de cada fígado, foram cortadas 4 porções de 400 mg de fatias, sendo duas amostras para o estudo da incorporação do acetato- $1-C^{14}$ sem adição de glicerol e outras duas com adição daquele composto ao meio incubador.

Toda a experiência foi assim efectuada com o mesmo par de animais, com o objectivo de reduzir ao mínimo a variação biológica.

Os resultados obtidos encontram-se no quadro IV, por onde se pode ver que a adição de glicerol, pelo menos nas concentrações da experiência, não exerce qualquer efeito apreciável na incorporação do acetato- $1-C^{14}$ nos fosfolípidos. É portanto de supor que a redução que temos observado em experiências anteriores na incorporação do acetato- $1-C^{14}$ nos fosfolípidos, no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal, não seja devida a uma diminuição da concentração de glicerol no fígado.

QUADRO IV

Efeito da adição de glicerol na incorporação de acetato- $1-C^{14}$ nos fosfolípidos de fatias de fígado

Animal	Glicerol adicionado (μ moles por frasco)	Actividade específica (imp./100 seg/mg)	Razão
Tratado	0	2 414	1,1
	20	2 662	
Testemunha	0	8 046	0,9
	20	7 580	

3.2.3 — Comparação da incorporação do palmitato-1-C¹⁴ com a do acetato-1-C¹⁴ nos lípidos de fígado de ratos tratados pela hormona do crescimento

É hoje geralmente aceite que o acetato é incorporado nos fosfolípidos e triglicéridos segundo o esquema que vem indicado na figura 5 (pág. 66). Nesse esquema podemos considerar duas partes distintas: a formação de ácidos gordos de cadeia longa, ou melhor, dos seus tioésteres com o Coenzima A, e a esterificação do α -glicerofosfato e subsequente transformação do produto formado nos lípidos complexos.

Com o objectivo de investigar o efeito da hormona do crescimento sobre a primeira parte do esquema (alongamento da cadeia) resolvemos estudar a incorporação de um ácido gordo de cadeia longa nos fosfolípidos do fígado de animais tratados pela hormona do crescimento, comparando-a com a incorporação do acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições.

O ácido gordo de cadeia longa usado nesta experiência foi o palmítico marcado com carbono 14 no grupo carboxilo.

Alíquotas da solução de Palmitato-1-C¹⁴ foram adicionadas, num erlenmeyer de rolha esmerilhada, a solução bicarbonato de Krebs-Ringer, previamente gasificada com uma mistura de oxigénio (95 %) e anidrido carbónico (5 %), de modo que a concentração final da mistura fosse 0,1 μ C/ml. O conjunto foi agitado e alíquotas transferidas para 4 frascos incubadores, a cada um dos quais foram adicionadas 400 mg de fatias hepáticas preparadas como ficou atrás descrito. Dois dos frascos continham fatias hepáticas provenientes de um animal injectado, 6 horas antes, com a hormona do crescimento, e outros dois, fatias de fígado provenientes de animais testemunhas.

Aos frascos foram adaptadas rolhas de borracha com 2 tubuladuras e o conjunto incubado durante 3 horas em termostato com agitação mecânica e mantido a $37^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$. Durante os primeiros 20 minutos de incubação fez-se passar através dos frascos uma corrente gasosa constituída por uma mistura de 95 % de oxigénio e 5 % de anidrido carbónico.

Paralelamente foi conduzido um ensaio em que os frascos incubadores continham, como marcador dos lípidos, acetato marcado com carbono 14 no grupo carboxilo.

Tanto no caso do palmitato-1-C¹⁴ como no do acetato-1-C¹⁴, as fatias de fígado usadas em cada experiência provinham do mesmo par de animais.

Terminada a incubação, os fosfolípidos e os lípidos neutros foram extraídos e purificados como ficou atrás descrito e a radioactividade das duas fracções medida.

Os resultados obtidos nas duas experiências vem indicados no quadro V, em que cada valor representa a média aritmética de 2 valores obtidos com duas amostras provenientes do mesmo fígado e trabalhadas separadamente.

É de notar que os dois precursores são largamente incorporados nas duas classes de lípidos e que os fígados de animais injectados com a hormona do crescimento incorporam menos acetato-1-C¹⁴ e palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e lípidos neutros.

Sendo, no entanto, a fracção a que chamamos lípidos neutros, uma mistura bastante complexa, de que fazem parte, entre outros compostos, triglicéridos, colesterol, ésteres do colesterol e ácidos gordos livres, torna-se difícil interpretar os resultados relativos àquela fracção. Por isso, esta fracção será mais tarde separada nos seus diversos componentes por cromatografia em coluna de ácido silícico.

O que tem interesse nesta altura é a diferença observada entre as reduções nas incorporações do acetato-1-C¹⁴ e palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos. Com efeito, os resultados do quadro V mostram clara-

QUADRO V

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do palmitato-1-C¹⁴ e acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos e lípidos neutros de fatias de fígado

EXPERIÊNCIA	PRECURSOR	FOSFOLÍPIDOS			LÍPIDOS NEUTROS		
		(Imp./100 seg./frasco)		Razão	(Imp./100 seg./frasco)		Razão
		Animal tratado	Animal testem.		Animal tratado	Animal testem.	
I	Acetato-1-C ¹⁴	2 683	19 720	0,14	38 083	69 520	0,55
	Palmitato-1-C ¹⁴	3 654	9 360	0,39	29 252	85 419	0,34
II	Acetato-1-C ¹⁴	3 728	12 800	0,29	47 493	58 634	0,81
	Palmitato-1-C ¹⁴	5 470	11 784	0,46	56 463	79 526	0,71

mente que a incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos é mais afectada do que a do palmitato-1-C¹⁴ nos mesmos fosfolípidos.

Porque, em cada experiência, os resultados foram obtidos com o mesmo par de animais e nas mesmas condições, as diferenças observadas entre o acetato-1-C¹⁴ e o palmitato-1-C¹⁴ só podem ser devidas a diferente comportamento dos dois precursores perante o tratamento hormonal.

3.2.4 — *O problema do grau de saturação dos ácidos gordos*

Sendo o ácido acético um precursor não só dos ácidos saturados, mas também dos não saturados, considerámos a hipótese de as diferentes respostas obtidas com o acetato-1-C¹⁴ e palmitato-1-C¹⁴ perante o tratamento hormonal serem devidas a diferente comportamento dos ácidos saturados e não saturados.

Nestas condições, resolvemos investigar se o efeito da hormona do crescimento na formação dos ácidos gordos do fígado depende do grau de saturação daqueles ácidos.

Para estudar este problema, os fosfolípidos do fígado de animais testemunhas e de animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento foram marcados com carbono 14, por incubação em solução bicarbonato de Krebs-Ringer, com acetato de sódio marcado com carbono 14 no grupo carboxilo.

Após saponificação, os ácidos gordos foram extraídos, separados em saturados e não saturados e medida a radioactividade das duas fracções.

Porque um ensaio deste género exige que se trabalhe com maiores quantidades de material do que temos usado nas operações anteriores de incubação, foram usados 2 gramas de fígado, em vez dos 400 mg habituais. A redução daquela quantidade de fígado a fatias exigiria um grande consumo de tempo, e como consequência, a incubação só poderia ser iniciada muito tempo após o animal ter sido sacrificado, com as consequentes alterações motivadas por uma longa exposição. Para evitar estes inconvenientes, o fígado foi colocado sobre um azulejo molhado com solução bicarbonato de Krebs-Ringer e esmagado com o fundo de um erlenmeyer. A pasta de fígado assim obtida foi depois transferida para frascos incubadores contendo 25 ml de solução bicarbonato de Krebs-Ringer e acetato de sódio marcado com carbono 14 no grupo carboxilo, em concentração final de 0,1 microcuries por mililitro.

As operações de incubação, extracção e purificação dos fosfolípidos foram efectuadas do modo habitual, com a diferença de as quantidades de reagentes e solventes terem sido aumentadas proporcionalmente.

Uma pequena porção dos fosfolípidos foi dissolvida em clorofórmio, pipetada em discos metálicos previamente tarados e o solvente removido por evaporação sob lâmpada de infra-vermelhos. Os discos foram novamente pesados e a radioactividade dos fosfolípidos medida como habitualmente.

Os restantes fosfolípidos foram saponificados num balão com refrigerante de refluxo com uma solução de hidróxido de sódio N/2 em etanol a 50 %, à temperatura de ebulição. A operação de saponificação durou 4 horas, ao fim das quais foi retirado o refrigerante de refluxo e o balão aquecido durante algum tempo para expulsar parte do álcool.

O conjunto foi deixado arrefecer e a solução transferida para um funil de decantação onde foi tornada ácida pela adição de ácido acético na presença de fenoltaleína. O balão foi lavado várias vezes com água e as águas de lavagem reunidas no funil de decantação. Os ácidos gordos foram extraídos por agitação com éter do petróleo (p. eb. 40°) e a fase etérea lavada várias vezes com água.

Alíquotas da solução dos ácidos gordos em éter do petróleo foram usadas para a medição da radioactividade.

A separação dos ácidos gordos em saturados e não saturados foi efectuada pelo método clássico dos sais de chumbo, em que se aproveita a maior solubilidade dos sais de chumbo dos ácidos não saturados.

Embora este método não conduza a uma separação completa dos dois tipos de ácidos (Leathes e Raper, 1925), achámo-lo, no entanto, satisfatório para o fim em vista.

O método, mais conhecido por método de Varrentrapp, tem sofrido algumas modificações e admite algumas variantes conforme o solvente usado. Seguimos, nas suas linhas gerais, o método descrito por Hilditch (1941).

O éter do petróleo foi removido por evaporação sob corrente de azoto e o resíduo foi dissolvido a quente em 3 ml de etanol. Foram adicionados 3 ml de uma solução fervente a 14 % de acetato de chumbo em etanol a 95 %, contendo 1,5 % de ácido acético glacial. Deixou-se assentar o precipitado durante a noite à temperatura ambiente e, no dia seguinte, o conjunto foi centrifugado e o sobrenadante separado e guardado à parte. O resíduo foi redissolvido a quente em 3 ml de

etanol contendo 0,75 % de ácido acético glacial e deixado arrefecer e repousar durante 4 horas. Após centrifugação, o sobrenadante foi reunido ao sobrenadante da operação anterior e o resíduo (resíduo I) guardado à parte. O solvente foi removido por evaporação e o resíduo (resíduo II) adicionado de éter e de uma solução aquosa de ácido clorídrico. O conjunto foi agitado e centrifugado para destruir a emulsão e permitir uma melhor separação das duas fases. A solução etérea, contendo a fracção dos ácidos gordos não saturados, foi lavada duas vezes com água.

O resíduo I, contendo os sais de chumbo dos ácidos saturados, foi igualmente agitado com éter e uma solução aquosa de ácido clorídrico e a fase etérea separada por centrifugação. A solução dos ácidos saturados em éter, depois de lavada com água, foi usada para a medição da radioactividade daquela fracção dos ácidos gordos.

Os resultados obtidos encontram-se no quadro VI.

Pode ver-se que a radioactividade específica dos fosfolípidos, assim como a dos ácidos gordos deles derivados, é menor no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal. No entanto, nenhuma diferença apreciável se encontra entre os ácidos saturados e não saturados, o que nos permite afirmar que a hormona do crescimento afecta igualmente as duas classes de ácidos gordos.

QUADRO VI

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos ácidos gordos saturados e não saturados dos fosfolípidos do fígado

	ACTIVIDADE ESPECÍFICA		RAZÃO
	(Imp./100 seg./mg)		
	Animal tratado	Animal testemunha	
Fosfolípidos	151	805	0,19
Mistura dos ácidos gordos	331	1 553	0,21
Ácidos saturados	464	2 187	0,21
Ácidos não saturados	156	880	0,18

3.2.5 — *A formação do palmitilcoenzima A a partir do palmitato*

Vimos que o fígado de um animal tratado pela hormona do crescimento incorpora menos palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do que o de um animal normal, o que mostra que o efeito da hormona faz-se sentir mesmo quando se parte já de um ácido gordo de cadeia longa.

Dada a possibilidade de as reduções observadas na incorporação do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos de animais tratados pela hormona do crescimento serem devidas a uma inibição daquela reacção de activação, resolvemos investigar o efeito daquela hormona sobre a formação do palmitilcoenzima A. Aquela reacção foi estudada em homogeneizados de fígado usando palmitato, marcado com carbono 14 no grupo carboxilo, como substrato. A adição de hidroxilamina ao meio incubador permite acumular os ácidos hidroxâmicos formados a partir dos tioésteres do coenzima A.

Sendo a activação do palmitato pelo coenzima A a primeira reacção do metabolismo daquele composto, e uma vez que, em presença da hidroxilamina, à medida que o palmitilcoenzima A se vai formando vai sendo acumulado na forma de ácidos hidroxâmicos, finda a incubação, apenas dois tipos de compostos são marcados com carbono 14, os ácidos hidroxâmicos e algum ácido palmítico que não reagiu. Assim, para o estudo da formação do palmitilcoenzima A pela técnica radioactiva, é suficiente separar a totalidade dos compostos existentes no fígado após a incubação, em duas fracções, com a condição de os ácidos hidroxâmicos formados a partir dos tioésteres do coenzima A e o ácido palmítico que não reagiu, não se encontrarem na mesma fracção.

O facto de os complexos férricos dos ácidos hidroxâmicos do ácido palmítico serem insolúveis em heptano, ao contrário do que sucede com o ácido palmítico (Kornberg e Pricer, 1953), permite efectuar aquela separação.

Os homogeneizados de fígado foram preparados em homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem (1936) em solução gelada de cloreto de sódio 0,154 molar. Alíquotas de 1 ml do homogeneizado, correspondendo a 0,2 g de fígado, foram transferidas para frascos incubadores contendo, em 4 ml de solução aquosa, 7,5 micromoles de cloridrato de hidroxilamina cujo pH tinha sido previamente ajustado para 7,4 pela adição de amónia e 0,125 micromoles de palmitato de sódio marcado com carbono 14 no grupo carboxilo.

Os frascos foram incubados em termostato com agitação mecânica a $37^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$ durante 2 horas, tendo ar por fase gasosa.

Finda a incubação, adicionou-se a cada frasco 5 ml de ácido perclórico a 10 % e o conjunto foi agitado e centrifugado. Devido à alta densidade da solução, grande parte da fase sólida tem tendência a permanecer à superfície, mesmo após centrifugação prolongada, o que torna difícil a separação das duas fases. A fase líquida foi retirada com o auxílio de uma seringa capilar, a fase sólida foi lavada mais duas vezes com porções de 5 ml de ácido perclórico a 3 %, o conjunto centrifugado e a solução sobrenadante desprezada. O resíduo foi extraído 3 vezes (porções de 3 ml) pelo reagente A de Hill (Hill, 1947) diluído 1:100 em metanol. A fase líquida foi transferida para um tubo de centrífuga e agitada com 3 ml de heptano, com o objectivo de remover o ácido palmítico. Esta operação foi repetida mais duas vezes, usando de cada vez 3 ml de heptano. Alíquotas da fase metanólica, que contém os complexos férricos dos ácidos hidroxâmicos, foi pipetada em discos metálicos e a radioactividade medida. Em cada experiência foram trabalhadas separadamente duas amostras de cada animal, figurando no quadro VII as médias desses dois valores.

QUADRO VII

Efeito da hormona do crescimento na formação do palmitilcoenzima A a partir do palmitato

EXPERIÊNCIA	RADIOACTIVIDADE (Imp./100 seg./frasco)		RAZÃO
	Animal testemunha	Animal tratado	
I	136 888	130 736	0,95
II	130 067	97 500	0,75
III	108 400	100 466	0,93

Os resultados apresentados naquele quadro mostram que a hormona do crescimento não exerce qualquer efeito apreciável na formação do palmitilcoenzima A a partir do palmitato e portanto não

pode aquela reacção ser responsável pelas reduções observadas na incorporação do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado de ratos submetidos ao tratamento hormonal.

3.2.6 — *A formação dos ácidos fosfatídicos*

Na sequência de reacções que conduzem à formação dos fosfolípidos, a esterificação do α -glicerofosfato por duas moléculas de acilcoenzima A, com a formação de ácidos fosfatídicos, desempenha um papel importante. Na verdade, é aqui que pela primeira vez aparece um lípido no verdadeiro sentido do termo.

Esta reacção foi estudada com o auxílio da técnica radioactiva, usando ortofosfato marcado com fósforo 32 como marcador da molécula dos lípidos.

O facto do ortofosfato ser precursor, não só dos ácidos fosfatídicos, mas também dos fosfolípidos do tipo lecitina e fosfatidiletanolamina, obriga-nos a tomar certas precauções.

É sabido, no entanto, que a incorporação do ortofosfato nas partículas celulares chamadas mitocôndrias dá-se quase exclusivamente nos fosfatídicos do tipo dos ácidos fosfatídicos (Kennedy, 1953; Dawson, 1954; Marinetti, Erbland e Albrecht, 1957). Aproveitámos este facto para estudar a esterificação do α -glicerofosfato pelo acilcoenzima A.

Os mitocôndrios usados nas diversas experiências foram preparados do seguinte modo: morto o animal, o fígado foi rapidamente removido, colocado num gobelé rodeado de gelo e contendo uma solução gelada de sacarose 0,25 molar, e homogeneizado num homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem, mantido em gelo durante a operação.

O homogeneizado foi centrifugado durante 5 minutos a 500 G numa centrífuga refrigerada mantida a 0°. A fracção depositada a esta velocidade de centrifugação e constituída principalmente por células que escaparam à desintegração, núcleos e alguns fragmentos celulares, foi desprezada. O sobrenadante foi de novo centrifugado em centrífuga refrigerada, mantida a 0°, a 8 000 r.p.m. (7 000 G) durante 10 minutos. Os mitocôndrios depositados a esta velocidade de centrifugação foram separados por decantação, suspensos por homogeneização em solução 0,25 molar de sacarose a baixa temperatura e em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, e o conjunto de novo centrifugado a 7 000 r.p.m. durante 10 minutos. Os mitocôndrios depositados

àquela velocidade de centrifugação foram suspensos num volume de sacarose 0,25 molar, tal que 1 ml da suspensão contivesse mitocôndrias provenientes de 0,7 gramas de fígado.

Foi adicionado 1 ml desta suspensão a cada um de vários frascos incubadores contendo cada um, em 2 ml de solução aquosa, 250 micromoles de sacarose, 15 micromoles de cloreto de magnésio, 3 micromoles de adenosinadifosfato (ADP), 50 micromoles de tampão «Tris» (Amino-2-hidroximetil-2-propano-1,3-diol), 100 micromoles de succinato de sódio e 0,3 microcuries de ortofosfato de sódio marcado com fósforo 32. O pH tinha sido previamente ajustado para 7,4 pela adição de uma solução diluída de soda cáustica. Os frascos foram incubados em termostato com agitação mecânica a 37,5° durante 1 hora tendo ar como fase gasosa.

Terminada a incubação, foram adicionados a cada frasco 5 ml de uma solução fria de ácido tricloroacético a 5 %, o conjunto centrifugado, desprezado o sobrenadante e o resíduo lavado mais duas vezes

QUADRO VIII

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do ortofosfato- P^{32} nos mitocôndrias do fígado de rato

EXPERIÊNCIA	RADIOACTIVIDADE (Imp./100 seg./frasco)		RAZÃO
	Animal testemunha	Animal tratado	
I	823	939	1,1
II	1 080	960	0,9
III	941	997	1,1

com 6 ml de uma solução do mesmo ácido. O resíduo foi suspenso em 1 ml de água e adicionados 4 ml de etanol a 95 %. O conjunto foi agitado com vareta de vidro e a fase líquida separada por centrifugação. O resíduo foi extraído mais duas vezes pelo etanol e os sobrenadantes, depois de cada centrifugação, foram reunidos num gobelé. Com o

objectivo de remover algum substracto que tivesse passado para a fase de etanol, uma alíquota de 5 ml do extracto foi agitada em tubo de vidro com tetracloreto de carbono e uma solução aquosa de cloreto de potássio e tampão fosfato (Kennedy e Weiss, 1956). A fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma seringa capilar e a operação de purificação repetida mais duas vezes. A fase orgânica foi reduzida a cerca de 1 ml e pipetada em discos metálicos para a medição da radioactividade do P^{32} , após remoção do solvente por evaporação.

Os resultados obtidos encontram-se no quadro VIII.

Pode ver-se que os mitocôndrias do fígado de um animal submetido ao tratamento hormonal incorporam praticamente a mesma quantidade de fósforo 32 nos lípidos que os de um animal normal.

3.2.7 — *A desfosforilação dos ácidos fosfatídicos*

Deve-se a Weiss, Smith e Kennedy (1956) a descoberta de um sistema enzimático no fígado do rato que catalisa a desfosforilação dos ácidos fosfatídicos com formação de diglicéridos e ortofosfato.

Dada a possibilidade de esta importante reacção da biosíntese dos lípidos ser responsável, pelo menos em parte, pelas reduções observadas na incorporação de certos precursores nos fosfolípidos do fígado de animais submetidos ao tratamento da hormona de crescimento, estudámos a formação de diglicéridos a partir dos ácidos fosfatídicos nos fígados de animais normais e submetidos ao tratamento hormonal.

Aquela reacção, pela sua natureza particular, dispensa no seu estudo o emprego da técnica radioactiva. Por cada molécula de diglicérido formado aparece uma molécula de ortofosfato. Assim, a determinação do ortofosfato formado a partir dos ácidos fosfatídicos dá-nos uma medida da quantidade de diglicérido formado.

Os ácidos fosfatídicos, preparados como atrás ficou descrito, foram transferidos para um homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem, adicionada água e o conjunto homogeneizado de modo a formar-se uma suspensão estável. O pH foi ajustado para 7,0 pela adição de uma solução diluída de hidróxido de sódio.

A desfosforilação dos ácidos fosfatídicos foi estudada num meio incubador contendo 1 ml da suspensão de ácidos fosfatídicos preparada como atrás ficou indicado e 4 ml de um homogeneizado de fígado de rato em tampão maleato de pH 6,5. O conjunto foi incubado durante

2 horas a 37° em termostato com agitação mecânica. Paralelamente foi feito um ensaio em branco em que foi omitido o substrato. Terminada a incubação, foram adicionados a cada frasco 4 ml de ácido perclórico a 5 % e o conjunto centrifugado; o sobrenadante foi transferido quantitativamente para um balão de 15 ml de capacidade e adicionado de 0,9 ml de ácido perclórico a 60 %, 1 ml de uma solução de molibdato de amónio a 5 %, 0,5 ml de ácido 1:2:4-aminonaftolsulfónico a 0,2 % e água até ao traço de referência. O conjunto foi transferido para tubos de centrífuga e centrifugado durante 5 minutos com o fim de se obter uma solução límpida. Aliquotas desta solução foram examinadas ao espectrofotómetro a 600 m μ para a determinação do fósforo.

Os resultados das 5 experiências vem indicados no quadro IX.

QUADRO IX

Efeito da hormona do crescimento na desfosforilação dos ácidos fosfatídicos

EXPERIÊNCIA	FÓSFORO LIBERTADO (μ moles/frasco)		RAZÃO
	Animal tratado	Animal testemunha	
I	3,26	2,74	1,2
II	2,11	2,30	0,9
III	2,75	2,54	1,1
IV	2,11	1,91	1,1
V	2,28	2,24	1,0

Cada frasco continha 14 micromoles de ácidos fosfatídicos, 200 micromoles de tampão maleato de pH 6,45 e 200 miligramas de homogeneizado de fígado de rato num volume total de 5 mililitros. Os frascos foram incubados durante 2 horas a 37°.

Os resultados indicados naquele quadro mostram que a desfosforilação dos ácidos fosfatídicos não é afectada pela hormona do crescimento.

3.2.3 — A incorporação da fosforilcolina- P^{32} nos fosfolípidos do fígado

O fósforo e a colina são incorporados na molécula da lecitina como uma unidade intacta (Rodbell e Hanahan, 1955; Kennedy e Weiss, 1956) e é conhecida uma kinase no fígado que catalisa a fosforilação da colina pelo adenosinatrifosfato (ATP) com formação de fosforilcolina (Wittenberg e Kornberg, 1953). A incorporação da fosforilcolina na lecitina, reacção observada pela primeira vez por Kornberg e Pricer (1952), exige a presença de citidinatrifosfato (CTP) sendo a citidinadifosfatocolina (CDP-Colina) um produto intermediário (Kennedy e Weiss, 1956).

Estudámos o efeito da hormona do crescimento na incorporação da fosforilcolina nos fosfolípidos do fígado usando, como marcador da molécula daquela classe de lípidos, fosforilcolina marcada com fósforo 32. Kennedy e Weiss (1956), que estudaram as condições favoráveis à incorporação da fosforilcolina nos lípidos, aconselham o uso de fracções celulares ricas em mitocôndrias e microsomas e que foram preparadas do seguinte modo: morto o animal, o fígado foi rapidamente removido, colocado num gobelé rodeado de gelo e contendo uma solução gelada de sacarose 0,25 molar, e homogeneizado num homogeneizador de vidro do tipo Potter-Elvehjem, mantido em gelo durante a operação.

O homogeneizado em solução de sacarose 0,25 molar foi centrifugado durante 5 minutos a 500 G e a 0°.

A fracção depositada a esta velocidade de centrifugação e constituída principalmente por células que escaparam à desintegração, núcleos e alguns fragmentos celulares, foi desprezada. O sobrenadante foi de novo centrifugado em centrífuga especial a 18 000 G durante 20 minutos e a 0°. A fracção depositada nestas condições, e que é constituída por mitocôndrias e alguns microsomas, foi separada por decantação, suspensa por homogeneização em solução 0,25 molar de sacarose fria e de novo centrifugada a 18 000 G durante 20 minutos e a 0°. A fracção depositada nestas condições, e que é constituída por mitocôndrias e alguns microsomas, foi separada por decantação, suspensa por homogeneização em solução 0,25 molar de sacarose fria e de novo centrifugada a 18 000 G durante 20 minutos e a 0°. A fracção depositada foi separada por decantação e suspensa em água de modo que 1 ml contivesse partículas provenientes de 0,4 gramas de fígado.

Alíquotas de suspensões assim preparadas foram transferidas para erlenmeyers de 30 ml contendo 20 micromoles de cloreto de magnésio, 100 micromoles de tampão fosfato de pH 7,4, quantidades variáveis de fosforilcolina marcada com fósforo 32, 10 micromoles de adenosinatrifosfato (ATP), 0,2 micromoles de citidinatrifosfato (CTP) e enzima proveniente de 0,4 gramas de fígado, num volume total de 2,0 ml. O pH foi ajustado para 7,4 pela adição de uma solução diluída de soda cáustica. Enquanto durou a incubação foram adicionados a cada frasco de 12 em 12 minutos 1,5 micromoles de ATP e 0,03 micromoles de CTP. A incubação durou 1 hora em termostato com agitação mecânica a 37°, tendo ar por fase gasosa.

Finda a incubação, foram adicionados 2 ml de uma solução fria de ácido tricloroacético a 10 %, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubos de centrifuga de 10 ml e a parte sólida foi separada por centrifugação. Após mais duas lavagens por uma solução fria a 5 % de ácido tricloroacético, separando de cada vez a parte sólida por centrifugação, os lípidos foram extraídos do seguinte modo: a parte sólida foi suspensa em 1 ml de água, adicionados 4 ml de etanol e o conjunto agitado com o auxílio de uma vareta de vidro durante algum tempo. O conjunto foi centrifugado, a parte sobrenadante foi decantada para um gobelé e a extracção pelo etanol foi repetida mais duas vezes, usando de cada vez 4 ml daquele solvente. Os extractos foram reunidos ao primeiro extracto e misturados. Esta solução de lípidos vem provavelmente contaminada por alguma fosforilcolina-P³² que não reagiu e que portanto iria interferir nas medições da radioactividade. Para evitar este inconveniente, uma alíquota de 5 ml do extracto alcoólico foi transferida para um tubo de vidro de rolha esmerilhada contendo 9 ml de tetracloreto de carbono e adicionada de 3 ml de uma solução aquosa 0,5 molar em fosfato dissódico e 2 molar em cloreto de potássio (Kennedy e Weiss, 1956). As duas fases foram equilibradas invertendo 100 vezes os tubos e a fase aquosa foi removida por meio de uma seringa capilar. Esta operação foi repetida mais duas vezes, conseguindo-se assim uma solução de lípidos não contaminada pela fosforilcolina-P³².

Alíquotas da solução dos lípidos em tetracloreto de carbono foram pipetadas em discos de níquel, o dissolvente removido por evaporação e a radioactividade medida. Os resultados obtidos na incorporação da fosforilcolina-P³² nos lípidos do fígado de ratos submetidos ao tratamento da hormona são comparados no quadro X com os obtidos com animais testemunhas.

QUADRO X

Efeito da hormona do crescimento na incorporação da fosforilcolina-P³² nos fosfolípidos do fígado de rato

EXPERIÊNCIA	Fosforilcolina-P ³² adicionada (μ moles/frasco)	Fosforilcolina-P ³² incorporada (m μ moles/frasco)		Razão
		Animal tratado	Animal testemunha	
I	4	6,3	4,6	1,4
II	10	9,8	6,9	1,4
III	18	12,3	9,5	1,3
IV	20	21,6	14,1	1,5

Pode ver-se que o fígado de um animal submetido ao tratamento hormonal incorpora mais fosforilcolina-P³² nos lípidos do que o de um animal normal. Este resultado, de certo modo surpreendente, será discutido com pormenor mais adiante.

3.2.9 — *A incorporação da glicina-2-C¹⁴ e do ortofosfato-P³² nos fosfolípidos de fatias hepáticas*

Aproveitámos o facto de a glicina-2-C¹⁴ marcar a molécula dos fosfolípidos exclusivamente na parte constituída pela base orgânica (Kline, McPherson, Pritchard e Rossiter, 1956) para confirmar os resultados obtidos com a fosforilcolina. A incorporação da glicina-2-C¹⁴ nos fosfolípidos de fatias de fígado foi comparada com a do ortofosfato-P³² e acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições.

Foram usadas porções de 400 mg de fatias hepáticas que foram incubadas em solução bicarbonato de Krebs-Ringer, previamente gasificada com uma mistura de oxigénio (95 %) e anidrido carbónico (5 %). O facto de as energias das partículas β do carbono 14 e do fósforo 32 serem bastante diferentes, permite estudar a incorporação da glicina-2-C¹⁴ e ortofosfato-P³² nos fosfolípidos, no mesmo frasco incubador.

Uma série de frascos continha glicina-2-C¹⁴ e ortofosfato-P³², cada um em concentração de 0,1 µC/ml, e outra série acetato-1-C¹⁴ na mesma concentração. Foi possível assim comparar os efeitos da hormona do crescimento na incorporação de 3 precursores dos fosfolípidos, usando fatias hepáticas provenientes de um mesmo par de animais e com um mínimo de frascos incubadores. A incubação durou 3 horas em termostato com agitação mecânica a 37° ± 0,3°, tendo como fase gasosa uma mistura de oxigénio (95 %) e anidrido carbónico (5 %). Após extracção e purificação dos fosfolípidos, a contagem da radioactividade do carbono 14, proveniente da glicina, e do fósforo 32 foi efectuada num contador sem janela Tracerlab SC-16, colocando sobre o disco metálico, contendo a amostra radioactiva dos fosfolípidos, um filtro de alumínio que absorvia toda a radiação β do carbono 14 e cujo factor para o fósforo 32 era 2,2.

Os resultados obtidos encontram-se no quadro XI.

QUADRO XI

Efeito da hormona do crescimento na incorporação da glicina-2-C¹⁴, ortofosfato-P³² e acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos de fatias de fígado

Precursor	Actividade específica (imp./min./mg)		Razão	Incorporação total (imp./min./frasco)		Razão
	Animal tratado	Animal testemunha		Animal tratado	Animal testemunha	
Glicina-2-C ¹⁴	581	586	1,0	4 959	3 786	1,3
Ortofosfato-P ³²	614	625	1,0	5 241	4 038	1,3
Acetato-1-C ¹⁴	84	483	0,17	712	3 120	0,23

Os resultados, quando expressos em termos da actividade específica, mostram que, nem a incorporação da glicina-2-C¹⁴, nem a do ortofosfato-P³² são afectadas pelo tratamento hormonal. No entanto, nenhuma conclusão se pode tirar da actividade específica quanto à síntese dos fosfolípidos, a não ser que se admitisse que a quantidade total de

fosfolípidos nos dois casos era a mesma, o que se tem verificado não ser o caso (Greenbaum e McLean, 1953; Greenbaum, Graymore e Slater, 1957). Quando se consideram as incorporações totais verifica-se que o fígado de um animal submetido ao tratamento da hormona do crescimento incorpora mais glicina-2-C¹⁴ e ortofosfato-P³² nos fosfolípidos do que o de um animal normal. Este resultado está de acordo com o obtido com a fosforilcolina-P³² e confirma assim os resultados obtidos na secção anterior. Quanto à incorporação do acetato-1-C¹⁴, mais uma vez se nota uma menor incorporação nos fosfolípidos no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal, quer se expressem os resultados em actividades específicas quer em incorporação total.

3.2.10 — *A separação cromatográfica dos lípidos neutros*

É sabido que a mobilização de gordura para o fígado, provocada pela hormona do crescimento, afecta principalmente os glicéridos, (Campbell e Lucas, 1951; Greenbaum e McLean, 1952), mas não se sabe qual das duas principais classes daqueles compostos (diglicéridos e triglicéridos) é afectada, ou se as duas. Se a mobilização afectar também os diglicéridos, a diluição provocada por aquela mobilização pode explicar a redução na incorporação do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos.

Para investigar estes pontos necessitamos separar as diversas classes de lípidos que constituem a fracção dos «lípidos neutros». Nesta separação foi usado o método cromatográfico em coluna de ácido silícico, que, embora envolvendo um enorme consumo de tempo (cerca de 1 000 fracções de 15 ml têm de ser evaporadas à secura, o resíduo pesado e a radioactividade medida) é, no entanto, o mais satisfatório.

Com o objectivo de se conseguir quantidades de lípidos suficientes para que cada fracção pudesse ser pesada com certa segurança, foram empregados os fígados de 4 animais injectados pela hormona do crescimento e os de 4 animais testemunhas. A redução daquela quantidade de fígado a fatias exige um grande consumo de tempo, e como consequência, a incubação só poderia ser iniciada muito tempo após o animal ter sido sacrificado, com as consequentes alterações motivadas por uma longa exposição. Para evitar estes inconvenientes, resolvemos preparar os fígados para a incubação do seguinte modo: mortos os animais, os

figados foram rapidamente removidos, colocados em gobelés rodeados de gelo e contendo solução bicarbonato de Krebs-Ringer, e pesados.

Com o auxílio de uma tesoura os figados foram reduzidos a pequenos fragmentos que foram em seguida colocados no corpo de uma seringa de plástico, cuja abertura tinha um diâmetro da ordem da espessura das fatias que costumávamos preparar. Fazendo forte pressão com o êmbolo fez-se passar os fragmentos de fígado através da abertura para frascos incubadores contendo, cada um, 30 ml de solução bicarbonato de Krebs-Ringer e acetato-1-C¹⁴ e ³²PO₄ H₂ Na em concentrações de 0,1 μ C/ml e 0,075 μ C/ml respectivamente.

A pasta de fígado assim obtida foi depois incubada durante 3 horas em termostato com agitação mecânica a 37° ± 0,3° e tendo como fase gasosa uma mistura de oxigénio (95 %) e anidrido carbónico (5 %).

Terminada a incubação adicionaram-se a cada frasco 10 ml de uma solução fria de ácido tricloroacético a 20 % e centrifugou-se, desprezando-se o sobrenadante. A parte sólida foi homogeneizada em ácido tricloroacético a 5 % e o conjunto centrifugado. O resíduo foi lavado mais duas vezes com porções de 10 ml do mesmo ácido e uma vez com água. O resíduo foi extraído uma vez com álcool etílico, quatro vezes com a mistura álcool-éter 3:1 e três vezes com éter, usando de cada vez porções de 10 ml. Os extractos, depois de misturados, foram evaporados à temperatura ambiente com o auxílio de um secador de cabelo e o resíduo reextraído quatro vezes com porções de 6 ml de éter do petróleo (p. eb. 40°-60°). O volume da solução de éter do petróleo foi reduzido a 4 ml com o auxílio de um secador de cabelo e os fosfolípidos foram precipitados pela adição de 30 ml de acetona fria. O conjunto foi deixado no frigorífico durante 30 minutos, ao fim dos quais os fosfolípidos foram separados por centrifugação, lavados com acetona fria e secos à trompa. Esta fracção dos fosfolípidos foi extraída três vezes a frio pelo etanol (porções de 30 ml), conseguindo-se assim uma separação em duas fracções: fracção solúvel (lecitinas) e fracção insolúvel (cefalinas e fosfatidos à base do inositol).

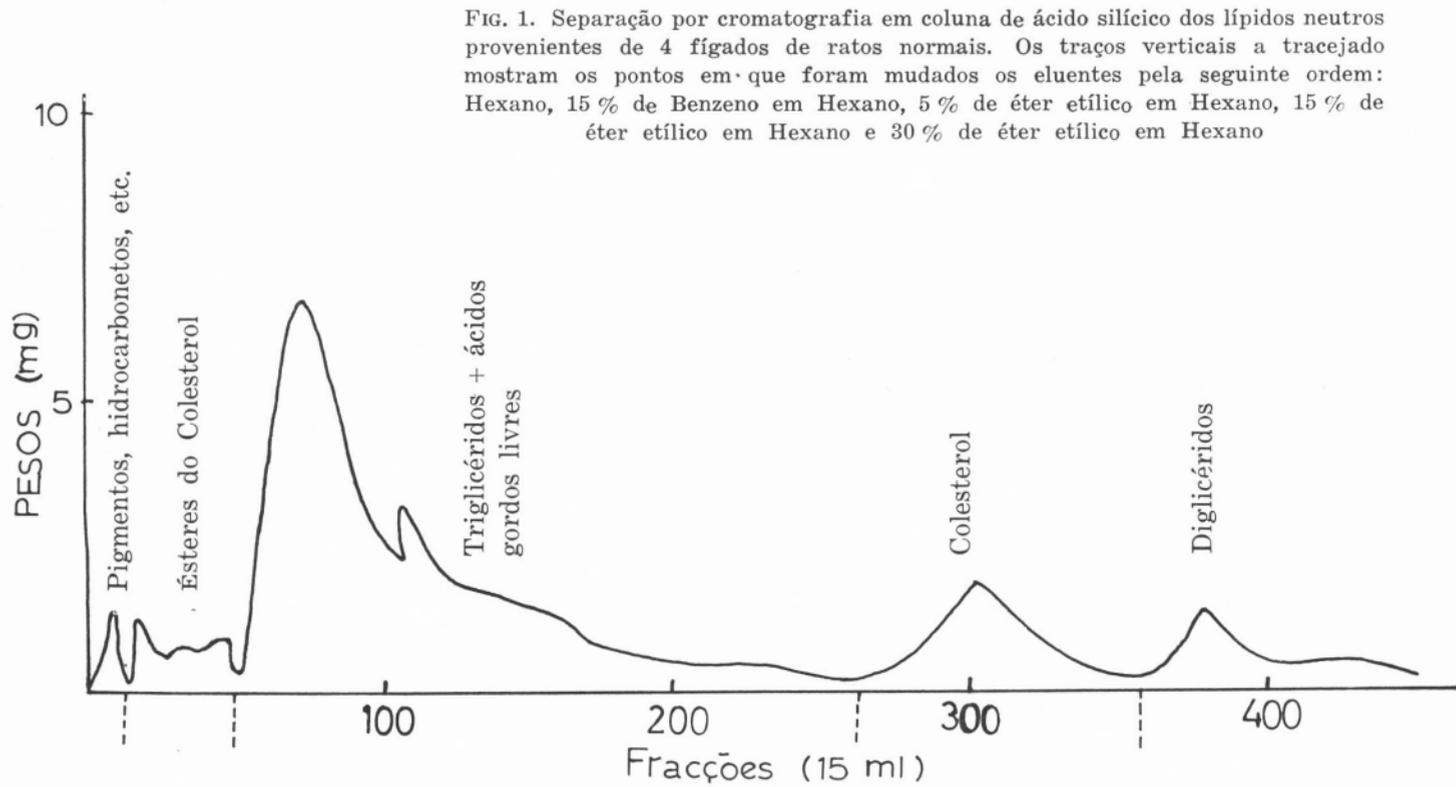
A fracção insolúvel em etanol foi dissolvida em clorofórmio e alíquotas das duas fracções foram pipetadas em discos metálicos para a medição da radioactividade do carbono 14 e fósforo 32, separando as duas radiações com um filtro de alumínio colocado sobre a amostra radioactiva e que absorvia completamente a radiação β do carbono 14.

A fracção dos lípidos solúvel em acetona (lípidos neutros) foi evaporada à secura, o resíduo extraído pelo hexano (p. eb. 67°-70°) e o conjunto centrifugado. O resíduo foi desprezado e a solução límpida sobrenadante foi aplicada a uma coluna de ácido silícico de 4 cm de diâmetro e contendo 60 gramas daquele adsorvente. O ácido silícico tinha sido previamente deixado durante 12 horas numa estufa a 110° e foi lavado sucessivamente com uma mistura de 5 % de éter etílico em hexano, 15 % de benzeno em hexano e finalmente com hexano, antes de se iniciar o processo cromatográfico. O conjunto foi adaptado a um colector de fracções automático e colectadas fracções de 15 ml que foram eluídas sucessivamente com hexano, 15 % de benzeno em hexano, 5 % de éter etílico em hexano, 15 % de éter etílico em hexano e 30 % de éter etílico em hexano, segundo o método de Barron e Hanahan (1958).

As fracções foram evaporadas de modo a obter-se um pequeno volume que foi transferido para discos de níquel de 5 cm² de área; o solvente foi evaporado sob lâmpada de infra-vermelhos, o resíduo pesado e a radioactividade medida. Sempre que o peso de uma fracção excedia 3 mg, e com o objectivo de reduzir ao mínimo a absorção na própria amostra, foram recolhidas alíquotas de cada fracção, a radioactividade medida e a radioactividade total da fracção calculada a partir da alíquota. Os resultados da separação cromatográfica podem ser observados nos cromatogramas das figuras 1, 2, 3 e 4 e em que em abcissas se encontram o número de fracções e em ordenadas os pesos de lípido correspondentes a cada fracção (fig. 1 e 2) ou a radioactividade total de cada fracção (fig. 3 e 4).

As fracções eluídas com hexano são constituídas por compostos que não são propriamente lípidos, principalmente pigmentos e hidrocarbonetos. A fracção seguinte, eluída pela mistura de 15 % de benzeno em hexano, é constituída pelos ésteres do colesterol; 5 % de éter etílico em hexano elui os triglicéridos e ácidos gordos livres, enquanto que misturas de 15 % de éter etílico em hexano e 30 % de éter etílico em hexano eluem o colesterol e os diglicéridos respectivamente.

A separação do colesterol dos triglicéridos e diglicéridos não é perfeita, mas esse inconveniente pode ser resolvido por determinação colorimétrica do colesterol, em clorofórmio, com anidrido acético e ácido sulfúrico, medindo a intensidade da coloração verde obtida ao espec-



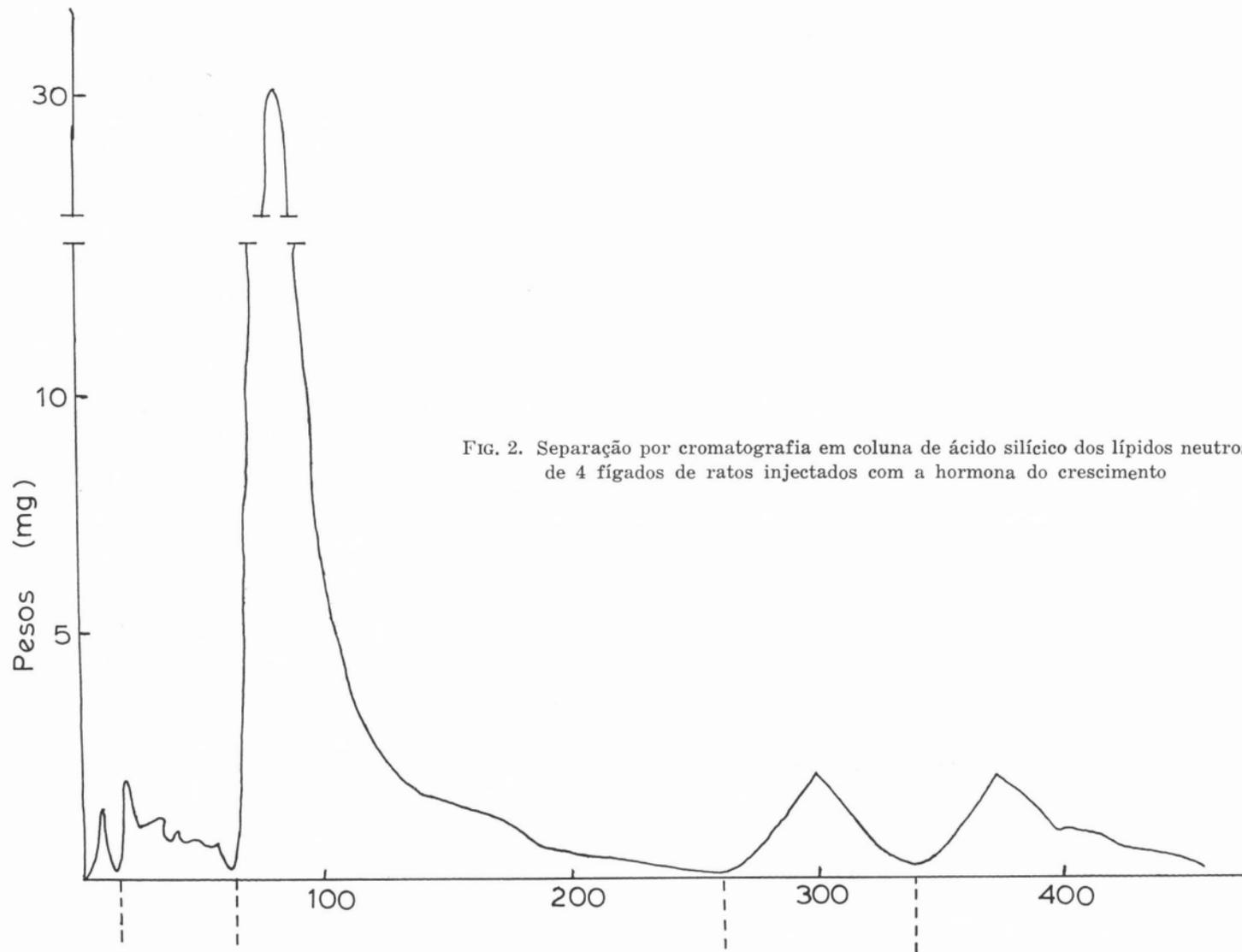


FIG. 2. Separação por cromatografia em coluna de ácido silício dos lípidos neutros de 4 fígados de ratos injectados com a hormona do crescimento

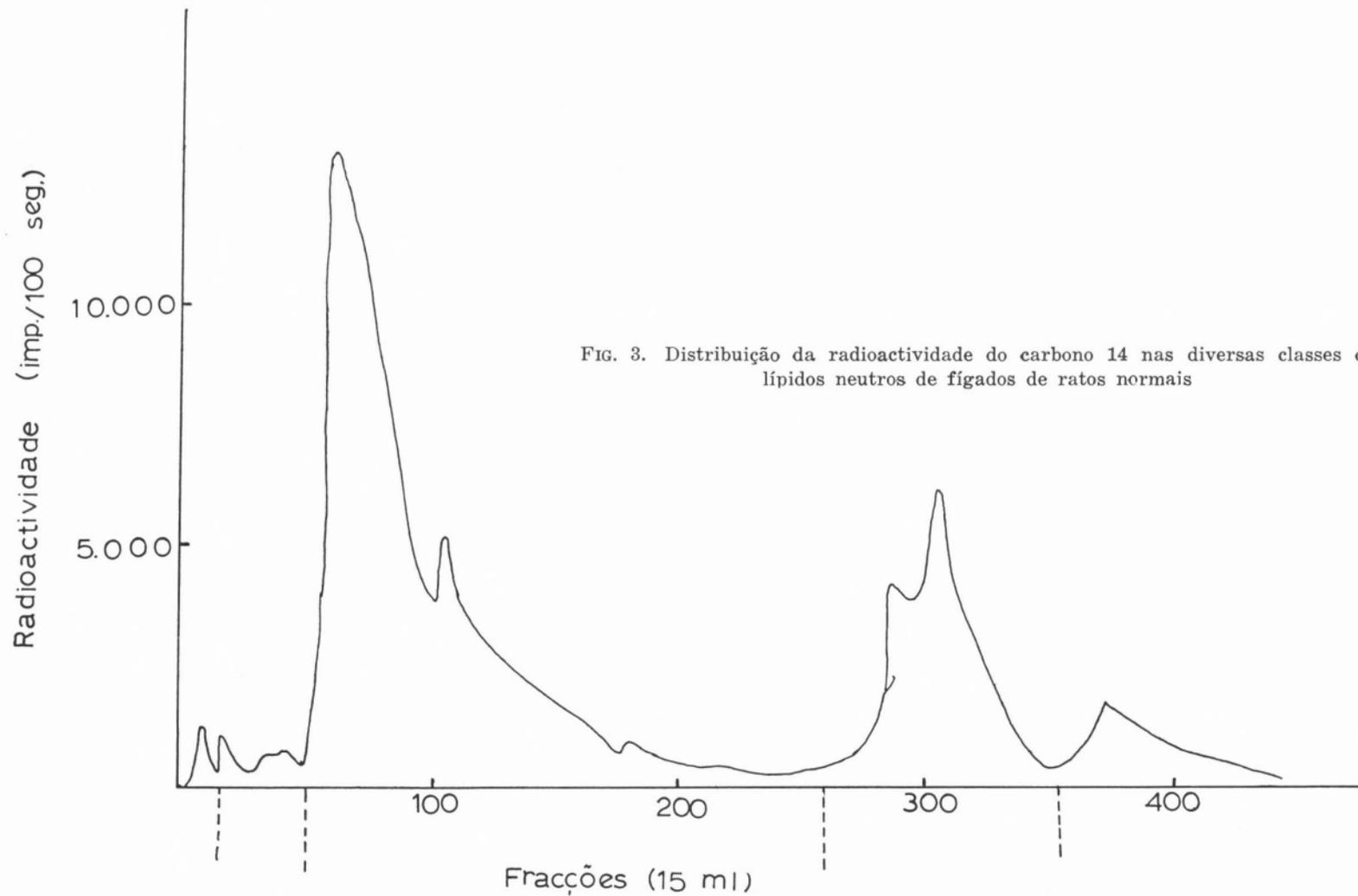
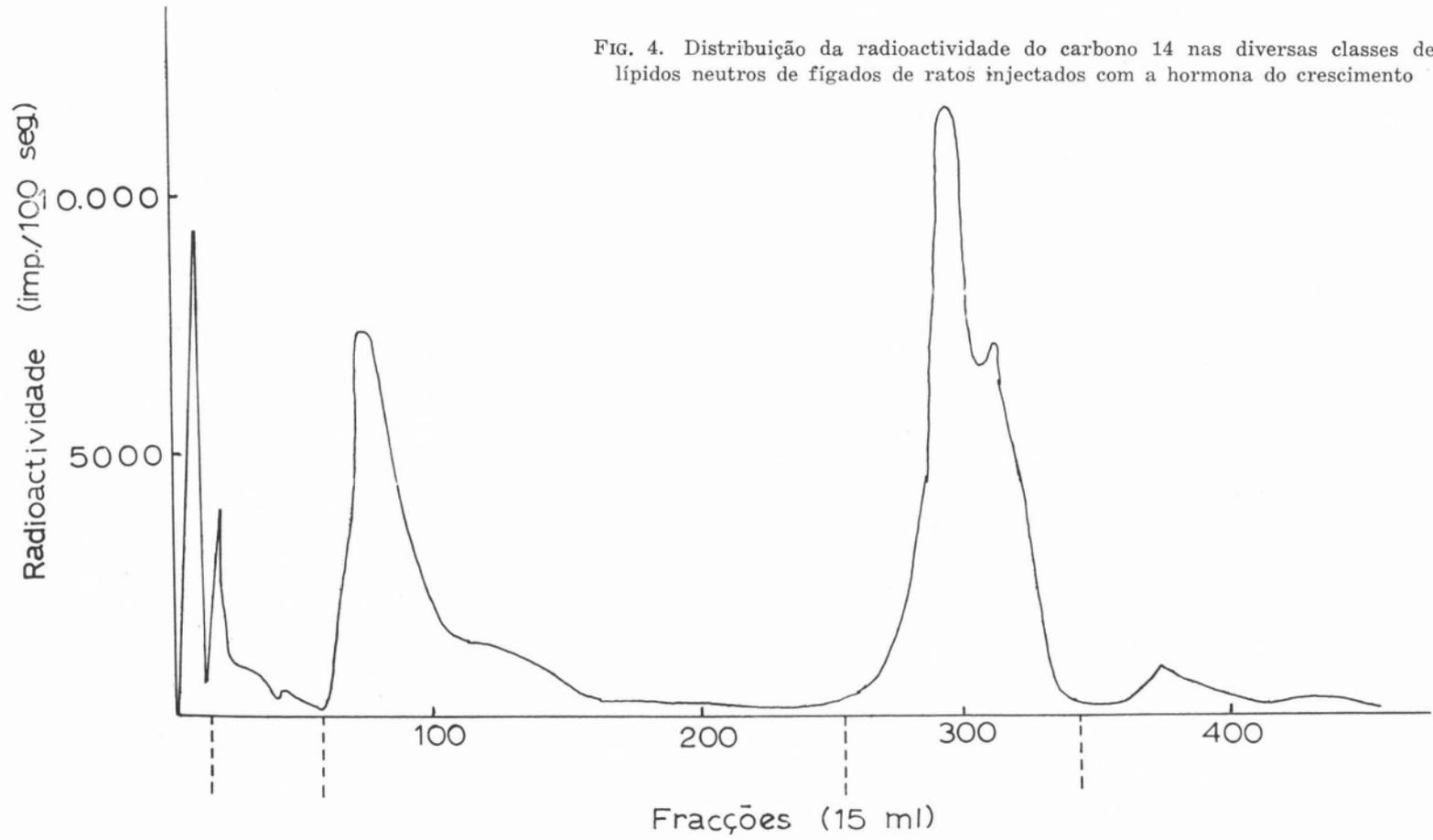


FIG. 4. Distribuição da radioactividade do carbono 14 nas diversas classes de lípidos neutros de fígados de ratos injectados com a hormona do crescimento



QUADRO XII

Efeito da hormona do crescimento na distribuição da radioactividade pelas diversas classes de lípidos do fígado

	PESO (mg)		RAZÃO	ACTIVIDADE ESPECÍFICA (Imp./min./mg)		RAZÃO	INCORPORAÇÃO TOTAL (Imp./min.)		RAZÃO
	Animal testemunha	Animal tratado		Animal testemunha	Animal tratado		Animal testemunha	Animal tratado	
Pigmentos, hidrocarbonetos	14,5	6,8	0,47	380	3 225	8,5	5 514	22 032	4,0
Ésteres do Colesterol	32,2	39,4	1,2	402	500	1,2	12 942	19 704	1,5
Triglicéridos	287	667	2,3	1 111	168	0,15	318 600	112 020	0,35
Colesterol	51	54	1,1	2 438	3 694	1,5	124 380	199 500	1,6
Diglicéridos	70,4	99	1,4	817	345	0,42	57 488	34 140	0,59
Lecitinas C ¹⁴	425	510	1,2	376	141	0,37	159 900	71 800	0,45
Lecitinas P ³²				281	257	0,91	119 580	131 280	1,1
Cefalinas C ¹⁴	126	151	1,2	489	167	0,34	61 620	25 260	0,41
Cefalinas P ³²				323	326	1,0	40 740	49 200	1,2

trofotómetro. Nas zonas de transição dos triglicéridos para o colesterol e deste para os diglicéridos, a análise colorimétrica dos glicéridos pelo método de Stern e Shapiro (1953) mostra uma pequena zona de contaminação. No entanto, foi sempre possível obter zonas do colesterol não contaminadas pelos glicéridos, o que nos permite determinar a actividade específica daquele composto com segurança.

A fracção eluída pela mistura de 5 % de éter etílico em hexano e que é constituída por uma mistura de triglicéridos e ácidos gordos livres (Barron e Hanahan, 1958) foi fraccionada num funil de decantação pelo método de Börgstrom (1952), obtendo-se assim a separação daquelas duas classes de compostos.

A comparação dos cromatogramas das figuras 1 e 2 mostra um grande aumento de triglicéridos no caso dos animais tratados pela hormona, mas este aumento é provocado por uma mobilização de triglicéridos de fontes exteriores, visto que a comparação dos cromatogramas das figuras 3 e 4 mostra que o fígado de um animal tratado pela hormona incorpora menos acetato marcado nos triglicéridos do que o de um animal normal, como se pode observar pela menor área da radioactividade. Os cromatogramas das figuras 3 e 4 mostram também um aumento na síntese do colesterol, mas a conclusão mais importante que se pode tirar da comparação dos vários cromatogramas, é, sem dúvida, o aumento na quantidade total de diglicéridos e a consequente redução na actividade específica. Este facto permite afirmar que a mobilização de gordura para o fígado afecta não só os triglicéridos, mas também os diglicéridos, e a diluição por ela provocada permite explicar a redução observada na incorporação do Palmitato- $1-C^{14}$ nos fosfolípidos e localizar assim o segundo ponto em que a hormona exerce a sua acção.

Dada a dificuldade natural em calcular com precisão as áreas limitadas pelas curvas dos cromatogramas, as diversas fracções correspondentes a cada classe de lípidos foram reunidas com o objectivo de determinar, para cada classe, a quantidade total de lípido, a actividade específica média e a radioactividade total. Esses resultados encontram-se reunidos no quadro XII.

Da comparação dos cromatogramas das figuras 3 e 4 salta ainda à vista que uma classe da fracção eluída pelo hexano incorpora muito mais radioactividade no caso dos fígados provenientes de animais tratados pela hormona do crescimento. O composto responsável por aquela radioactividade não foi identificado. É possível que se trate de algum precursor do colesterol.

3.2.11 — *A incorporação do glicerol-1-C¹⁴ nos fosfolípidos, as diversas classes de diglicéridos e a especificidade dos enzimas*

A maior quantidade de diglicéridos existentes nos fígados dos animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento (quadro XII) pode explicar, pelo menos em parte, as menores incorporações do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal, e ser assim responsável por parte das reduções observadas na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos mesmos fosfolípidos. Com efeito, sendo os diglicéridos intermediários obrigatórios na síntese dos fosfolípidos e triglicéridos (Smith, Weiss e Kennedy, 1957; Weiss, Smith e Kennedy, 1956; Weiss, Kennedy e Kiyasu, 1960; Weiss, Smith e Kennedy, 1958; Weiss e Kennedy, 1956), a incorporação de uma mesma quantidade de carbono 14 nos diglicéridos dos animais tratados pela hormona e testemunhas, originaria, no primeiro caso, uma «pool» de diglicéridos mais diluída em radioactividade. Nestas condições, mesmo admitindo que as reacções de formação dos fosfolípidos ou triglicéridos a partir dos diglicéridos não são afectadas pelo tratamento hormonal, teríamos sempre menos radioactividade nos fosfolípidos e triglicéridos no caso dos animais injectados com a hormona do crescimento. No entanto, devemos ter presente que os diglicéridos são famílias de compostos, diferindo entre si não só pela posição dos ácidos gordos que esterificam o glicerol, mas também pelo comprimento da cadeia e grau de saturação desses ácidos.

Dizer-se que os diglicéridos são precursores comuns dos triglicéridos e fosfolípidos não significa que a composição dos ácidos gordos dos fosfolípidos e triglicéridos seja a mesma. Na verdade, os enzimas que catalisam a síntese dos fosfolípidos e triglicéridos podem ser específicos para diglicéridos com diferente composição de ácidos gordos.

Por exemplo, sabe-se que os enzimas que catalisam a formação dos triglicéridos a partir dos diglicéridos, podem actuar sobre o diglicérido dilaurina, enquanto que este mesmo substracto parece ser completamente inactivo para a formação da lecitina (Weiss, Kennedy e Kiyasu, 1960). Suponhamos, para simplificar o raciocínio, que existem apenas 3 classes de diglicéridos, a saber, os que dão origem aos triglicéridos (D_T), os que vão originar os fosfolípidos (D_F) e uma terceira classe (D_X) que não desempenha qualquer papel na formação daquelas duas classes de lípidos. Se o aumento de diglicéridos provocado pela hormona do crescimento afectar, por exemplo, apenas as classes D_T e D_X , é evidente que não poderá ser responsável pelas menores incorporações

dos precursores usados, nos fosfolípidos. É preciso portanto mostrar que a classe de diglicéridos precursores dos fosfolípidos é também afetada pela mobilização de gordura para o fígado. Para resolvermos este problema estudámos a incorporação do glicerol, marcado com carbono 14 no carbono 1, nos fosfolípidos do fígado de ratos normais e tratados pela hormona do crescimento.

Foram usadas fatias hepáticas que foram incubadas em solução bicarbonato de Krebs-Ringer em termostato com agitação mecânica a $37^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$ durante 3 horas, tendo como fase gasosa uma mistura de oxigénio (95 %) e anidrido carbónico (5 %). Finda a incubação, os fosfolípidos foram extraídos, purificados e a sua radioactividade medida como habitualmente. Os resultados das várias experiências encontram-se reunidos no quadro XIII, em que são comparadas as incorporações do glicerol-1-C¹⁴ e acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado de ratos normais e submetidos ao tratamento hormonal.

QUADRO XIII

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do glicerol-1-C¹⁴ nos fosfolípidos de fatias de fígado de rato

EXPERIÊNCIA	PRECURSOR	IMP./MIN./FRASCO		RAZÃO
		Animal tratado	Animal testemunha	
I	Glicerol-1-C ¹⁴	5 630	7 322	0,76
	Acetato-1-C ¹⁴	1 211	5 784	0,21
II	Glicerol-1-C ¹⁴	3 357	4 123	0,81
	Acetato-1-C ¹⁴	505	3 494	0,14
III	Glicerol-1-C ¹⁴	5 063	7 291	0,69
	Acetato-1-C ¹⁴	2 237	7 680	0,29

Pode ver-se que os fígados de animais tratados pela hormona do crescimento incorporam menos glicerol-1-C¹⁴ e acetato-1-C¹⁴ nos fosfo-

lípidos do que os de animais testemunhas, mas que as diferenças são maiores para o acetato do que para o glicerol. O facto de a incorporação do glicerol ser afectada mostra que, em face dos outros resultados até aqui obtidos, a classe dos diglicéridos precursores dos fosfolípidos é afectada pela mobilização de gordura para o fígado, sendo portanto este um possível segundo ponto onde a hormona do crescimento exerce a sua acção inibidora na incorporação de certos precursores nos fosfolípidos.

3.2.12 — *A síntese do colesterol no fígado de animais tratados pela hormona do crescimento*

Os resultados do quadro XII, assim como os cromatogramas das figuras 3 e 4, mostram que o fígado de um animal tratado pela hormona do crescimento incorpora mais acetato-1-C¹⁴ no colesterol do que o de um animal normal. Resultados semelhantes foram obtidos por Greenbaum e Glascock (1957) usando piruvato-2-C¹⁴. No entanto, que se saiba, nenhuma tentativa foi feita até ao presente para determinar o ponto em que a hormona exerce aquele efeito, desconhecendo-se qual a reacção do esquema que traduz a biosíntese do colesterol que é afectada pelo tratamento hormonal.

Pensámos que o estudo da incorporação de um precursor do colesterol mais complexo pudesse auxiliar a resolver aquele problema. Com este objectivo em vista, estudámos a incorporação do ácido mevalónico-2-C¹⁴ no colesterol do fígado, comparando-a com a do acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições, o que permite analisar separadamente 2 partes do esquema: acetato-ácido mevalónico e ácido mevalónico-colesterol.

Foram usadas fatias hepáticas que foram incubadas durante 3 horas em solução bicarbonato de Krebs-Ringer contendo alguns microcuries de acetato-1-C¹⁴ ou ácido mevalónico-2-C¹⁴. Cada frasco continha 400 mg de fatias em 5 ml de solução e o conjunto foi mantido em termostato com agitação mecânica a $37^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$ durante 3 horas. Passado este intervalo de tempo, o conjunto foi centrifugado e os lípidos extraídos como habitualmente. Após a precipitação dos fosfolípidos pela acetona fria e cloreto de magnésio, o conjunto foi centrifugado e o sobrenadante transferido para um gobelé e evaporado à secura sob corrente de ar. O resíduo foi saponificado pela potassa alcoólica a quente, depois do que o conjunto foi transferido para um funil de decantação, adicionado de um volume igual de água e a parte

não saponificável extraída pelo éter do petróleo de ponto de ebulição 40°-60° C. O pH da fase aquosa foi tornado ácido pela adição de ácido sulfúrico e os ácidos gordos extraídos pelo éter do petróleo. O volume da parte não saponificável foi reduzido a cerca de 2 ml por evaporação sob corrente de ar e adicionados 2 ml de uma solução de digitonino a 0,2 % em álcool etílico a 50 %. O conjunto foi agitado fortemente e levado à ebulição. Após arrefecimento, foram adicionados 5 ml de acetona e o conjunto centrifugado. O precipitado, contendo o complexo de digitonino e colesterol, foi lavado duas vezes com acetona e duas com éter. Uma suspensão do precipitado em clorofórmio foi usada para a medição da radioactividade.

Os resultados da incorporação do ácido mevalónico-2-C¹⁴ no colesterol do fígado são comparados no quadro XIV com os da incorporação do acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições.

QUADRO XIV

Efeito da hormona do crescimento na incorporação do ácido mevalónico-2-C¹⁴ no colesterol de fatias de fígado de rato

EXPERIÊNCIA	PRECURSOR	RADIOACTIVIDADE (Imp./min./frasco)		RAZÃO
		Animal tratado	Animal testemunha	
I	Ac. mevalónico	18 426	17 994	1,0
	Acetato	5 124	2 709	1,9
II	Ac. mevalónico	24 418	26 700	0,9
	Acetato	11 311	1 860	6,1
III	Ac. mevalónico	21 168	21 120	1,0
	Acetato	8 782	2 117	4,1

Pode ver-se que apenas a incorporação do acetato-1-C¹⁴ é afectada pelo tratamento hormonal, não tendo a hormona qualquer efeito sobre a incorporação do ácido mevalónico-2-C¹⁴ no colesterol.

4 — DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As menores incorporações de certos precursores nos lípidos do fígado de animais injectados com hormona do crescimento têm sido interpretadas, por vários autores, em termos de uma redução na taxa de formação desses lípidos. É de notar, no entanto, que a maioria dos autores que se ocuparam deste assunto exprimiram os resultados da incorporação em radioactividade específica, isto é, radioactividade por miligrama de lípido. Em face das grandes quantidades de gordura existentes no fígado de um animal tratado pela hormona do crescimento (Greenbaum e McLean, 1953 b; Li, Simpson e Evans, 1949 b; Szego e White, 1949; Weil e Ross, 1949), as menores incorporações do acetato-1-C¹⁴ nos lípidos do fígado dos animais tratados pela hormona, expressas em actividades específicas, podem ser o resultado de uma diluição provocada por gordura de origem extrahepática, sem que a incorporação total do precursor nos lípidos seja afectada.

Os resultados apresentados no quadro III, no entanto, mostram claramente que a quantidade total de carbono 14 do acetato incorporada nos fosfolípidos e lípidos neutros do fígado de ratos submetidos ao tratamento hormonal, é bastante menor do que a incorporada no caso dos animais testemunhas. Estes resultados confirmam os obtidos por Greenbaum e Glascock (1957) com os fosfolípidos do fígado.

Posta de parte a hipótese de as reduções observadas na incorporação nos fosfolípidos serem devidas a uma diminuição da concentração de glicerol livre no fígado (quadro IV), e uma vez que essas reduções são maiores com o acetato-1-C¹⁴ do que quando o palmitato-1-C¹⁴ é usado como substrato, parece provável que os diferentes comportamentos dos dois substratos sejam devidos ou a um aumento na forma-

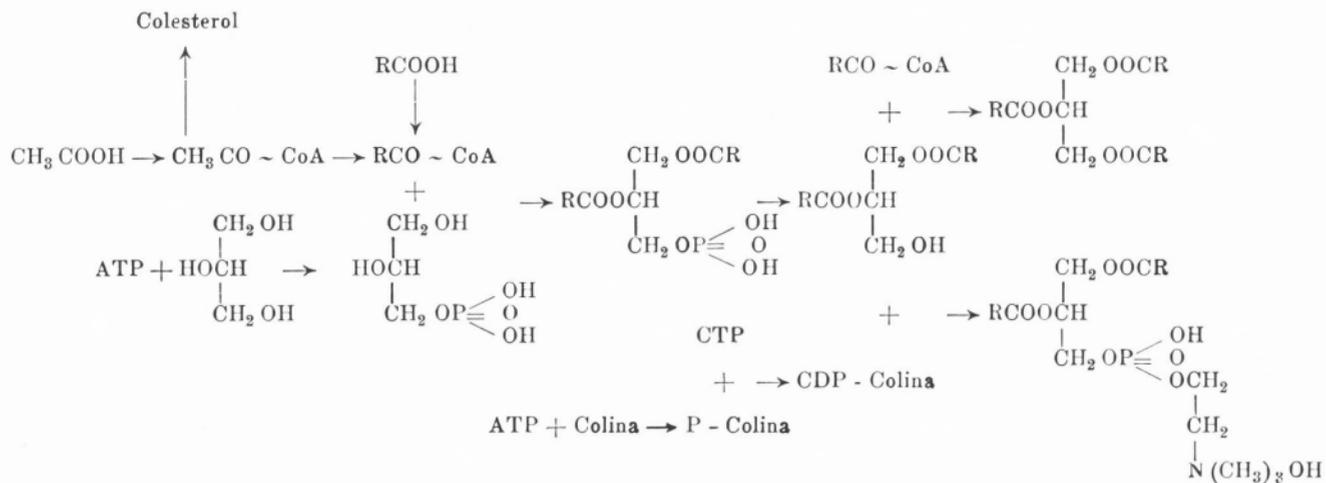


FIG. 5. Esquema da biosíntese dos fosfolípidos e triglicéridos

ABREVIATURAS:

ATP, adenosinatrifosfato;
 CTP, citidinatrifosfato;
 P-Colina, fosforilcolina;
 CDP-Colina, citidinadifosfatocolina;
 CoA, coenzima A.

ção de palmitilcoenzima A a partir do palmitato, ou à inibição de alguma reacção compreendida entre o acetato e os tioésteres do coenzima A e dos ácidos gordos de cadeia longa (fig. 5).

Um estudo da reacção que conduz à formação do palmitilcoenzima A a partir do palmitato, mostra que a produção do palmitilcoenzima A não é aumentada nos animais tratados pela hormona. Por outro lado, o facto de o acetato ser incorporado no colesterol em maior quantidade no caso dos animais submetidos ao tratamento hormonal, associado ao facto de a biosíntese do colesterol e lípidos complexos se fazer segundo um esquema que é comum até ao acetilcoenzima A, parece mostrar que o efeito da hormona de crescimento na biosíntese dos ácidos gordos se faz sentir na parte do esquema compreendida entre o acetilcoenzima A e os tioésteres dos ácidos gordos de cadeia longa com o coenzima A.

Se as menores incorporações do acetato nos fosfolípidos, no caso dos animais tratados pela hormona do crescimento, fossem devidas exclusivamente a uma inibição da síntese dos ácidos gordos de cadeia longa a partir de precursores simples como o acetato, seria de esperar que a incorporação nos fosfolípidos de um ácido gordo de cadeia longa, como o ácido palmítico, não fosse afectada pelo tratamento hormonal. Em vez disso, obtiveram-se reduções suficientemente grandes, para mostrar que, mesmo partindo de um ácido gordo de cadeia longa, se observam ainda reduções apreciáveis na incorporação nos fosfolípidos.

Devido à mobilização de gordura do tecido adiposo para o fígado nos animais tratados pela hormona do crescimento (Greenbaum e McLean, 1953 b; Li, Simpson e Evans, 1949; Szego e White, 1949; Weil e Ross, 1949) temos de considerar a hipótese de as menores incorporações do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos, observadas nos animais injectados pela hormona, serem devidas a uma diluição da «pool» dos ácidos gordos livres do fígado pelos ácidos gordos livres provenientes do tecido adiposo. Esta hipótese, no entanto, é pouco provável, em face dos trabalhos de Reshef e Shapiro (1960) que mostraram que a hormona do crescimento não exercia qualquer efeito na libertação de ácidos gordos do tecido adiposo. Além disso, as experiências que efectuámos com o fim de estudar a formação do palmitilcoenzima A a partir do palmitato (quadro VII) deveria dar conta de qualquer diluição deste tipo. As pequeníssimas diferenças observadas neste caso, por si só, não são suficientes para explicar as grandes reduções na incorporação do palmitato nos fosfolípidos no caso dos animais tratados pela hormona.

No entanto, devemos ter presente que tomámos o ácido palmítico como representante dos ácidos gordos de cadeia longa. Na verdade, ele poderá, quanto muito, ser tomado como representante da série dos ácidos saturados, nada nos garantindo *a priori* que os resultados seriam os mesmos se tivéssemos partido de um ácido não saturado, o oleico, por exemplo. A separação dos ácidos gordos constituintes dos fosfolípidos em saturados e não saturados, nos animais injectados pela hormona e testemunhas, mostrou, no entanto, que a hormona afectava igualmente as duas classes de ácidos gordos.

Em face dos resultados obtidos, quere-nos parecer que haverá, pelo menos, quatro possibilidades de explicar as reduções observadas na incorporação do palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos, a saber:

- 1 — A formação dos ácidos gordos de peso molecular superior ao do palmítico, a partir deste ácido, ou seja, o alongamento da cadeia carbonada, é prejudicada pela hormona do crescimento;
- 2 — grande parte do ácido palmítico é transformado em fragmentos menores, como o acetilcoenzima A, resintetizado e incorporado nos fosfolípidos;
- 3 — que há uma diluição ao nível do palmitilcoenzima A ou de outro acilcoenzima A de peso molecular superior, provocada por compostos provenientes de fontes extrahepáticas;
- 4 — que existe um outro ponto no esquema da biosíntese dos lípidos (fig. 5), situado entre os tioésteres dos ácidos gordos de cadeia longa e os fosfolípidos, em que a hormona do crescimento exerce uma acção inibidora na incorporação do palmitato nos fosfolípidos.

Das restantes reacções estudadas, nem a esterificação do α -glicerofosfato pelo acilcoenzima A com formação de ácidos fosfatídicos, nem a desfosforilação destes com produção de diglicéridos, parecem ser afectadas pelo tratamento hormonal. A separação dos lípidos neutros, por cromatografia em coluna de ácido silícico, mostrou que no fígado de um animal tratado pela hormona do crescimento existe mais diglicéridos do que no de um animal normal. A comparação das actividades específicas daqueles compostos nos dois casos mostra que há realmente uma diluição ao nível dos diglicéridos. Este facto, só por si, não permite afirmar que esta diluição seja responsável pela

menor incorporação do carbono 14 de alguns precursores nos fosfolípidos. Com efeito, sabemos que os diglicéridos são famílias de compostos, que diferem entre si não só pela posição dos ácidos gordos que esterificam o glicerol, mas também pelo comprimento da cadeia e grau de saturação desses mesmos ácidos. Dizer que os diglicéridos são precursores comuns dos fosfolípidos e dos triglicéridos não significa que a composição dos ácidos gordos nos dois tipos de compostos seja a mesma, e é natural que existam enzimas específicos para os vários tipos de diglicéridos. No entanto, as experiências que efectuámos, e em que os fosfolípidos foram marcados na parte da molécula constituída pelo glicerol, mostram que a diluição pelos diglicéridos deve afectar a classe daqueles compostos que são precursores dos fosfolípidos. Estaria assim localizado o segundo ponto em que a hormona do crescimento exerce a sua acção na incorporação de certos precursores marcados nos fosfolípidos.

Deve, no entanto, salientar-se, que a separação cromatográfica dos lípidos neutros foi efectuada a partir de lípidos que tinham sido extraídos do fígado após 3 horas de incubação em solução de Krebs-Ringer, e é possível que durante aquele tempo tenha havido alteração na composição dos lípidos. Sabe-se, por exemplo, que os fosfolípidos sofrem autólise com libertação de ácidos gordos e formação de lisofosfolípidos quando incubados em condições semelhantes (Fairbairn, 1945), e é possível que os triglicéridos sofram também alterações nas mesmas condições.

Finalmente, a incorporação da fosforilcolina- P^{32} nos fosfolípidos do fígado mostrou que aquele precursor dos lípidos é incorporado mais rapidamente nos fosfolípidos do fígado dos animais tratados pela hormona. Greenbaum e McLean (1953) tinham notado um aumento de fosfolípidos no fígado de rato 6 horas após administração de hormona do crescimento. No entanto, o método por eles usado não lhes permitia tirar qualquer conclusão quanto à origem daqueles lípidos. As diferenças observadas por aqueles autores tanto podiam ser o resultado de um aumento na síntese daqueles compostos no fígado como consequência da mobilização de gordura para o fígado, proveniente de fontes extrahepáticas. Os resultados agora obtidos com a fosforilcolina parecem indicar que o aumento de fosfolípidos observado por Greenbaum e McLean é, na verdade, devido a um aumento na formação daqueles compostos no fígado.

Ao contrário do que sucede com os lípidos, a incorporação do acetato- $1-C^{14}$ no colesterol é aumentada pela hormona do crescimento.

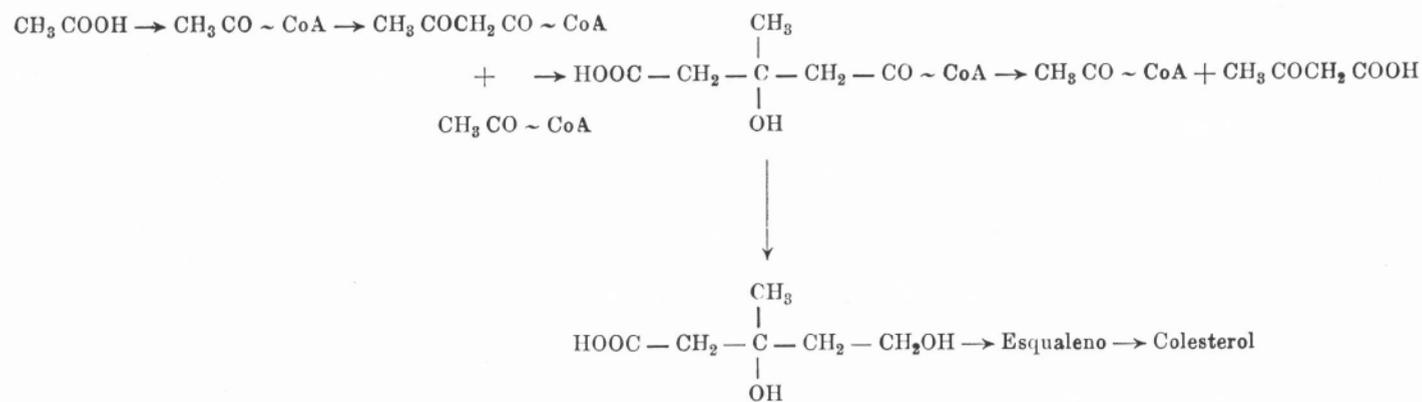


FIG. 6. Esquema da biosíntese do colesterol e ácido acetilacético a partir do acetato

Vão-se tornando cada vez mais frequentes na literatura os casos em que as incorporações do acetato- C^{14} nos lípidos e no colesterol são afectadas em sentidos opostos. É o que acontece por exemplo em animais diabéticos (Hotta e Chaikoff, 1952), injectados com tiroxina (Fletcher e Myant, 1958), forçados a ingerir grandes quantidades de lípidos (Hill, Webster, Linazasoro e Chaikoff, 1960) e hipofisectomizados (Brady, Lukens e Gurin, 1951; Gurin e Brady, 1953; Tomkins, Chaikoff e Bennett, 1952).

Embora a síntese do colesterol no fígado dos mamíferos não esteja ainda totalmente esclarecida, há, no entanto, certos factos que são sobejamente conhecidos. Sabe-se, por exemplo, que um dos produtos intermediários na biosíntese do colesterol é o ácido mevalónico (Tavormina, Gibs e Huff, 1956). Aqueles autores, trabalhando com ácido mevalónico-2- C^{14} , obtiveram grandes incorporações do carbono radioactivo no colesterol. Contudo, quando ácido mevalónico-1- C^{14} é usado como precursor, nenhuma radioactividade aparece no colesterol (Tavormina e Gibbs, 1956), o que parece sugerir que o composto é primeiramente descarboxilado antes de ser incorporado na molécula do colesterol. A conversão de ácido mevalónico-2- C^{14} em esqualeno por homogeneizados de fígado de rato tem sido observada em vários laboratórios (Dituri, Rabinowitz, Hullin e Gurin, 1957; Cornforth, Cornforth, Popjak e Youhotsky-Gore, 1957). Por outro lado, experiências em vários laboratórios (Schwenk, Todd e Fish, 1954; Tchen e Bloch, 1955) têm mostrado que o esqualeno- C^{14} pode ser convertido em colesterol.

No esquema da figura 6 estão resumidos os nossos conhecimentos actuais sobre a biosíntese do colesterol no fígado. Foi com base naquele esquema que procurámos investigar qual o ponto em que a hormona exerce a sua acção na incorporação do acetato-1- C^{14} no colesterol.

Os resultados do quadro XIV mostram que, embora a incorporação do acetato-1- C^{14} no colesterol seja acelerada pela hormona do crescimento, a incorporação do ácido mevalónico naquele composto não é afectada pelo tratamento hormonal. Parece portanto que o efeito estimulante da hormona na síntese do colesterol se faz sentir na parte compreendida entre o acetato e o ácido mevalónico. Em face dos resultados de Greenbaum e Glascock (1957) que mostraram que a produção de $^{14}CO_2$ a partir do grupo carboxilo do piruvato não é alterada por injeção de hormona do crescimento, é lógico concluir que o efeito estimulante da hormona está localizado para além do acetilcoenzima A.

A parte do esquema compreendida entre o acetilcoenzima A e o β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A é comum à síntese do colesterol e à formação de acetato. Por outro lado, sabe-se que, seis horas após injeção de hormona de crescimento, a produção de acetato pelo fígado é fortemente reduzida (Greenbaum e McLean, 1953 a). Parece portanto lógico concluir, em face dos resultados do quadro XIV e do esquema da figura 6, que o efeito da hormona do crescimento na biosíntese do colesterol se faz sentir na formação do ácido mevalónico a partir do β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A pela β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A redutase. Tudo se passa como se a hormona desviasse o β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A da formação de acetato, canalizando-o no sentido da formação de ácido mevalónico. A subsequente transformação de ácido mevalónico em colesterol não é afectada pela hormona do crescimento. É interessante notar que, resultados até certo ponto semelhantes, têm aparecido recentemente na literatura em vários casos em que a biosíntese do colesterol no fígado é afectada. Assim, Bucher, McGarrah, Gould e Loud (1959), que estudaram os efeitos do jejum prolongado, irradiação pelos raios X, dieta rica em colesterol e injeções de «Triton» na incorporação do acetato e ácido mevalónico marcados com carbono 14 no colesterol, verificaram que as maiores diferenças observadas se encontravam antes do ácido mevalónico. Resultados semelhantes foram obtidos por Garattini, Paoletti e Paoletti (1960) com animais jejuados ou injectados com «Triton». Azarnoff e Curran (1957), estudando o efeito da adição de vanádio, e Scaife e Migicovsky (1957) trabalhando com animais privados de alimentação durante algum tempo, verificaram que os efeitos se faziam sentir entre o β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A e o esqualeno. Gould e Popjak (1957) estudaram o efeito de uma dieta rica em colesterol na incorporação do acetato e ácido mevalónico marcados com carbono 14 no colesterol, e verificaram que a incorporação do ácido mevalónico se mantinha inalterado apesar das grandes reduções na incorporação do acetato. Resultados semelhantes foram obtidos por Fletcher e Myant (1958) com animais injectados com tiroxina. Bucher, Overath e Lynen (1960), num interessante estudo sobre o efeito do jejum por períodos de 24 horas na biosíntese do colesterol no fígado do rato, chegaram à conclusão que a reacção afectada era também a transformação do β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A em ácido mevalónico. Resultados semelhantes foram obtidos por Siperstein e Guest (1960) com animais submetidos a uma dieta rica em colesterol.

5 — RESUMO (*)

Estuda-se o efeito da hormona do crescimento na biosíntese dos lípidos e colesterol do fígado de rato com o auxílio da técnica radioactiva.

A incorporação nos lípidos de um ácido gordo de cadeia longa, marcado com carbono 14 no grupo carboxilo, é estudada em animais normais e submetidos ao tratamento hormonal, e essa incorporação comparada com a do acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições (3.2.3).

É também estudado o efeito da hormona do crescimento na incorporação da glicina-2-C¹⁴ (3.2.9), glicerol-1-C¹⁴ (3.2.11) e fosforilcolina-P³² (3.2.8) nos fosfolípidos do fígado.

Os resultados obtidos mostram que o fígado de um animal injectado com a hormona do crescimento incorpora menos palmitato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do que o de um animal normal, mas que as diferenças são maiores para o acetato do que para o palmitato.

Investiga-se o efeito da adição de glicerol, *in vitro*, na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado de animais tratados pela hormona (3.2.2), e observa-se que aquela adição não altera as diferenças observadas na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado de animais normais e submetidos ao tratamento hormonal.

Estuda-se separadamente o efeito da hormona do crescimento na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos ácidos gordos saturados e não saturados (3.2.4.). Os resultados obtidos mostram que a hormona afecta igualmente as duas classes de ácidos gordos.

(*) Por razão de brevidade incluiu-se neste resumo apenas os tópicos que constituem contribuição original.

É também estudado o efeito da hormona do crescimento na transformação do palmitato em palmitilcoenzima A (3.2.5), na esterificação do α -glicerofosfato por 2 moléculas de acilcoenzima A (3.2.6.) e na desfosforilação dos ácidos fosfatídicos (3.2.7), concluindo-se que aquelas reacções não são afectadas pelo tratamento hormonal.

A incorporação da fosforilcolina, marcada com fósforo 32, nos lípidos do fígado é investigada em animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento. Da comparação dos resultados obtidos com animais testemunhas e submetidos ao tratamento hormonal depreende-se que a hormona estimula a incorporação daquele composto nos lípidos do fígado (quadro X). Resultados semelhantes foram obtidos com a incorporação da glicina-2-C¹⁴ nos fosfolípidos (quadro XI).

A incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos diglicéridos, triglicéridos, lecitinas, cefalinas e ésteres do colesterol do fígado é também investigada em animais submetidos ao tratamento da hormona do crescimento e essa incorporação comparada com a obtida em animais normais (3.2.10). A totalidade dos lípidos do fígado de animais injectados pela hormona e testemunhas foi marcada com carbono 14, por incubação num meio contendo acetato-1-C¹⁴, e os lípidos neutros foram separados por cromatografia em coluna de ácido silícico. Da comparação dos cromatogramas (fig. 1, 2, 3 e 4) depreende-se que há mais diglicéridos e triglicéridos no fígado de um animal submetido ao tratamento hormonal, mas que a radioactividade específica daqueles compostos é menor.

Verifica-se também que a hormona do crescimento provoca uma maior incorporação do carbono 14 do acetato nos ésteres do colesterol.

Discutem-se várias hipóteses e conclui-se que o efeito da hormona na incorporação do acetato-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado se faz sentir, pelo menos, em dois pontos do esquema do biosíntese: um que é localizado entre o acetilcoenzima A e os tioésteres do coenzima A com os ácidos gordos de cadeia longa, e o outro devido a uma diluição da radioactividade ao nível dos diglicéridos.

Os resultados obtidos na incorporação do glicerol-1-C¹⁴ nos fosfolípidos do fígado mostram que aquela diluição afecta também a classe dos diglicéridos que vão dar origem aos fosfolípidos (quadro XIII).

É estudada a incorporação do ácido mevalónico-2-C¹⁴ no colesterol do fígado de animais injectados com hormona do crescimento e essa incorporação comparada com a do acetato-1-C¹⁴ nas mesmas condições (3.2.12.). Os resultados mostram que o efeito da hormona na biosíntese do colesterol no fígado se faz sentir na parte do esquema situada

antes do ácido mevalónico (quadro XIV). Considerações várias levam-nos a localizar o efeito da hormona do crescimento na biosíntese do colesterol no fígado, na transformação de β -hidroxi- β -metil-glutaril-coenzima A em ácido mevalónico pela β -hidroxi- β -metil-glutarilcoenzima A redutase.

6 — SUMMARY

The effect of administration of pituitary growth hormone on lipid and cholesterol synthesis in rat liver has been investigated.

The incorporation of a long chain fatty acid into the liver phospholipids of growth hormone treated rats is studied and a comparison is made of the rates of incorporation of acetate-1-C¹⁴ and palmitate-1-C¹⁴ into the liver phospholipids in growth hormone treated animals.

The incorporation of labelled compounds such as glycine-2-C¹⁴, glycerol-1-C¹⁴ and phosphorylcholine-P³² into the liver phospholipids of growth hormone treated animals is also studied. The results show that the liver of treated animals incorporate less palmitate-1-C¹⁴ into the liver phospholipids than controls, the differences being greater for acetate-1-C¹⁴ than for palmitate-1-C¹⁴.

The effect of the addition of unlabelled glycerol *in vitro* on the incorporation of acetate-1-C¹⁴ into the phospholipids of liver slices is also investigated. The results show that the incorporation of that precursor of phospholipids, both in treated animals and controls, is unaffected by the addition of glycerol to the medium.

A study is made of the incorporation of C¹⁴ from acetate into saturated and unsaturated fatty acids from liver phospholipids in growth hormone treated rats and controls. From the results one can see that both classes of fatty acids are affected by hormone injections and to the same extent.

The activation of palmitic acid by coenzyme A, the esterification of α -glycerophosphate by thioesters of long chain fatty acids and coenzyme A and the dephosphorylation of phosphatidic acids are also studied in the livers of growth hormone treated animals.

The results show that those reactions proceed at the same speed in treated animals and controls.

The livers from treated animals and controls were incubated in a Krebs-Ringer bicarbonate solution containing acetate-1-C¹⁴, and the lipids were extracted and fractionated using silicic acid columns.

The incorporation of labelled carbon from acetate into diglycerides, triglycerides, lecithins, kephalins and cholesterol esters was studied for the first time in the livers of growth hormone treated rats.

From the chromatograms obtained one can see that there are more diglycerides and triglycerides in growth hormone treated animals than in controls, but the specific activities of those compounds are lower than in livers from controls.

It can also be seen that growth hormone causes an increase on the incorporation of acetate-1-C¹⁴ into cholesterol esters.

From the results obtained it appears that the lower rate of incorporation of carbon 14 from acetate into phospholipids may be accounted for in terms of the inhibition of some steps between acetyl-coenzyme A and palmitylcoenzyme A and a dilution of the diglyceride pool in the livers of growth hormone treated animals.

Studies on the incorporation of glycerol-1-C¹⁴ into the liver phospholipids from treated animals show that growth hormone decreases the incorporation of that precursor into phospholipids. It thus appears that those diglycerides giving rise to phospholipids are also affected by hormone treatment.

The incorporation of phosphorylcholine into the liver phospholipids of treated animals and controls is also investigated. The results obtained show clearly that that precursor is incorporated into the phospholipids of the injected animals at a rate about one-third greater than in the control animals, and at about the same rate as the incorporation of phosphorus and glycine.

The incorporation of labelled mevalonic acid into the liver cholesterol of growth hormone treated animals is also investigated and that incorporation is compared with the one of acetate-1-C¹⁴ in the same conditions. Experimental results show that, while the incorporation of acetate carbon into cholesterol is speeded up in growth hormone treated rats, the rate of incorporation of mevalonic acid remains unchanged. It thus appears that the increased rate of cholesterol formation is due to a diversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A from acetoacetate formation, and an increased rate of reduction of the β -hydroxy- β -methyl glutaryl coenzyme A to mevalonic acid by the β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase.

8 — BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, A., MEDES, G. e WEINHOUSE, S., *J. Biol. Chem.*, **221**, 333 (1956).
AZARNOFF, D. L. e CURRAN, G. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2968 (1957).
BARRETT, H. M., BEST, C. H. e RIDOUT, J. H., *J. Physiol.*, **93**, 367 (1938).
BARRON, E. J. e HANAHAN, D. J., *J. Biol. Chem.*, **231**, 493 (1958).
BATES, R. W., LOANES, T. e RIDDLE, O., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **33**, 446 (1935).
BENNETT, L. L., KREISS, R. E., LI, C. H. e EVANS, H. M., *Amer. J. Physiol.*, **152**, 210 (1948).
BEST, C. H. e CAMPBELL, J., *J. Physiol.*, **86**, 190 (1936).
BEST, C. H. e CAMPBELL, J., *J. Physiol.*, **92**, 91 (1938).
BIERRING, E. e NIELSEN, E., *Biochem. J.*, **26**, 1015 (1932).
BORGSTRÖM, B., *Acta Physiol. Scand.*, **25**, 111 (1952).
BRADY, R. O., LUKENS, F. D. W. e GURIN, S., *J. Biol. Chem.*, **193**, 459 (1951).
BRUCE, H. M. e PARKES, A. S., *J. Hyg., Camb.*, **44**, 491 (1946).
BUCHER, N. L. R., MCGARRAHN, K., GOULD, E. e LOUD, A. V., *J. Biol. Chem.*, **234**, 242 (1959).
BUCHER, N. L. R., OVERATH, P. e LYNEN, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 491 (1960).
BURN, J. H. e LING, H. W., *J. Physiol.*, **69**, Proc. XIX (1930).
CAMPBELL, J. e LUCAS, C. C., *Biochem. J.*, **48**, 241 (1951).
CHAIKOFF, I. L., *Harvey Lect.*, **47**, 99 (1951-52).
COOPE, R. e CHAMBERLAIN, E. N., *J. Physiol.*, **60**, 69 (1925).
CORNFORTH, J. W., CORNFORTH, R. H., POPJAK, G. e YOUHOTSKY-GORE., *Biochem. J.*, **66**, 10P. (1957).
DAWSON, R. M. C., *Biochem. J.*, **57**, 237 (1954).
DITURI, F., RABINOWITZ, J. L., HULLIN, R. P. e GURIN, S., *J. Biol. Chem.*, **229**, 825 (1957).
EVANS, H. M. e LONG, J. A., *Anat. Rec.*, **21**, 62 (1921).
FAIRBAIRN, D., *J. Biol. Chem.*, **157**, 645 (1945).
FLETCHER, K. e MYANT, N. B., *J. Physiol.* **144**, 361 (1958).
FRIEDBERG, F. e GREENBERG, D. M., *Arch. Biochem.*, **17**, 193 (1948).
GAEBLER, O. H., *J. Exp. Med.*, **57**, 349 (1933).

- GARATTINI, S., PAOLETTI, P. e PAOLETTI, R., *Biochemistry of Lipids*, p. 184., Ed. G. Popjak, Pergamon press (London, 1960).
- GLICK, D., *J. Biol. Chem.*, **156**, 643 (1944).
- GOULD, R. G. e POPJAK, G., *Biochem. J.*, **66**, 51P (1957).
- GREENBAUM, A. L., *Biochem. J.*, **54**, 400 (1953).
- GREENBAUM, A. L., «The Hypophyseal growth hormone, nature and actions», p. 330 (1955). Ed. Smith, R. W., Gaebler, O. H. e Long, C. N. H. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- GREENBAUM, A. L., *Biochem. J.*, **63**, 159 (1956).
- GREENBAUM, A. L. e GLASCOCK, R. F., *Biochem. J.*, **67**, 360 (1957).
- GREENBAUM, A. L., GRAYMORE, C. N. e SLATER, T. F., *J. Endocrin.*, **15**, 235 (1957).
- GREENBAUM, A. L. e McLEAN, P., *Biochem. J.*, **54**, 413 (1953 (a)).
- GREENBAUM, A. L. e McLEAN, P., *Biochem. J.*, **54**, 407 (1953 (b)).
- GREENBAUM, A. L. e YOUNG, F. G., *Nature, Lond.*, **165**, 521 (1950).
- GREENBAUM, A. L. e YOUNG, F. G., *J. Endocrin.*, **9**, 127 (1953).
- GURIN, S. e BRADY, R. O., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **8**, 571 (1953).
- HANAHAH, D. J., TURNER, M. B. e JAYKO, M. E., *J. Biol. Chem.*, **192**, 623 (1951).
- HARRISON, H. C. e LONG, C. N. H., *J. Biol. Chem.*, **133**, 209 (1940).
- HILDITCH, T. P., «The industrial chemistry of fats and waxes», p. 87 (1941). 2.^a ed. Bailliere, Tindall and Cox, London.
- HILL, U. T., *Anal. Chem.*, **19**, 932 (1947).
- HILL, R., WEBSTER, W. W., LINAZASORO, J. M. e CHAIKOFF, I. L., *J. Lipid Research*, **1**, 150 (1960).
- HOBERMAN, H. D., *Yale J. Biol. Med.*, **22**, 341 (1950).
- HOTTA, S. e CHAIKOFF, I. L., *J. Biol. Chem.*, **198**, 895 (1952).
- KATES, M., *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 575 (1955).
- KENNEDY, E. P., *J. Biol. Chem.*, **201**, 399 (1953).
- KENNEDY, E. P., *Fed. Proc.*, **16**, 847 (1957).
- KENNEDY, E. P. e WEISS, S. B., *J. Biol. Chem.*, **222**, 193 (1956).
- KING, E. J., *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
- KLINE, D., McPHERSON, C., PRITCHARD, E. T. e ROSSITER, R. J., *J. Biol. Chem.*, **222**, 219 (1956).
- KORNBERG, A. e PRICER, W. E., Jr., *Fed. Proc.*, **11**, 242 (1952).
- KORNBERG, A. e PRICER, W. E., Jr., *J. Biol. Chem.*, **204**, 329 (1953).
- LEATHES, J. B. e RAPER, H. S., «The fats», p. 82 (1925). 2.^a ed. Longmans, Green and Co., London.
- LEE, M. e AYRES, G. B., *Endocrinology*, **20**, 489 (1936).
- LEE, M. e SCHAFFER, N. K., *J. Nutrit.*, **7**, 337 (1934).
- LEVIN, L. e FARBER, R. K., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **7**, 399 (1952).
- LI, C. H., *Harvey Lect.*, **46**, 181 (1950-51).
- LI, C. H., *Science*, **123**, 617 (1956).
- LI, C. H. e EVANS, H. M., *Science*, **99**, 183 (1944).
- LI, C. H. e EVANS, H. M., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **3**, 3 (1948).
- LI, C. H., EVANS, H. M. e SIMPSON, M. E., *J. Biol. Chem.*, **159**, 353 (1945).
- LI, C. H., EVANS, H. M. e SIMPSON, M. E., *Science*, **108**, 624 (1948).

- LI, C. H., SIMPSON, M. E. e EVANS, H. M., *Growth*, **12**, 39 (1948).
- LI, C. H., SIMPSON, M. E. e EVANS, H. M., *Endocrinology*, **44**, 71 (1949 a).
- LI, C. H., SIMPSON, M. E. e EVANS, H. M., *Arch. Biochem.*, **23**, 51 (1949 b).
- LORAINE, J., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **7**, 431 (1952).
- MARINETTI, G. V., ERBLAND, J. e ALBRECHT, M., *Fed. Proc.*, **16**, 216 (1957).
- MARX, W., MAGY, D. B., SIMPSON, M. E. e EVANS, H. M., *Amer. J. Physiol.*, **137**, 544 (1942).
- PERRY, W. F. e BOWEN, H. F., *Endocrinology*, **56**, 579 (1955).
- PLIMMER, R. H. A. e BURCH, W. J. N., *Biochem. J.*, **31**, 398 (1937).
- POTTER, V. R. e ELVEHJEM, C. A., *J. Biol. Chem.*, **114**, 495 (1936).
- RESHEF, L. e SHAPIRO, B., *Metabolism*, **9**, 551 (1960).
- RILEY, R. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 512 (1944).
- RODBELL, M. e HANAHAN, D. J., *J. Biol. Chem.*, **214**, 607 (1955).
- RUSSELL, J. A. e CAPIELLO, H., *Endocrinology*, **44**, 333 (1949).
- RUSSEL, J. A., *Amer. J. Physiol.*, **121**, 755 (1938).
- SCAIFE, J. F. e MIGICOVSKY, B. B., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 615 (1957).
- SCHOOLEY, J. P., RIDDLE, O. e BATES, R. W., *Anat. Rec.*, **72**, 90 (1938).
- SCHWENK, E., TODD, D. e FISH, C. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **49**, 187 (1954).
- SHIPLEY, R. A. e LONG, C. N. H., *Biochem. J.*, **32**, 2242 (1938).
- SIPERSTEIN, M. D. e GUEST, M. J., *J. Clin. Invest.*, **39**, 642 (1960).
- SMITH, P. E., *Amer. J. Anat.*, **45**, 205 (1930).
- SMITH, S. W., WEISS, S. B. e KENNEDY, E. P., *J. Biol. Chem.*, **228**, 915 (1957).
- STADIE, W. C., *Physiol. Rev.*, **25**, 395 (1945).
- STADIE, W. C. e RIGGS, B. C., *J. Biol. Chem.*, **154**, 687 (1944).
- STERN, I. e SHAPIRO, B., *J. Clin. Pathol.*, **6**, 158 (1953).
- STETTEN, D., Jr. e SALCEDO, J., Jr., *J. Biol. Chem.*, **156**, 27 (1944).
- SZEGO, C., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **7**, 423 (1952).
- SZEGO, C. M. e WHITE A., *Endocrinology*, **44**, 150 (1949).
- TAVORMINA, P. A. e GIBBS, M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6210 (1956).
- TAVORMINA, P. A., GIBBS, M. H. e HUFF, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498 (1956).
- TCHEN, T. T. e BLOCH, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6085 (1955).
- TOMKINS, G. M., CHAIKOFF, I. L. e BENNETT, L. L., *J. Biol. Chem.*, **199**, 543 (1952).
- WARBURG, O. e CHRISTIAN, W., *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1942).
- WEIL, R. e ROSS, S., *Endocrinology*, **45**, 207 (1949).
- WEISS, P., «The Hypophyseal growth hormone, nature and actions» (1955).
Ed. Smith, R. W., Gaebler, O. H. e Long, C. N. H. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- WEISS, S. B. e KENNEDY, E. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3550 (1956).
- WEISS, S. B., KENNEDY, E. P. e KIYASU, J. Y., *J. Biol. Chem.*, **235**, 40 (1960).
- WEISS, S. B., SMITH, S. W. e KENNEDY, E. P., *Nature*, **178**, 594 (1956).
- WEISS, S. B., SMITH, S. W. e KENNEDY, E. P., *J. Biol. Chem.*, **251**, 53 (1958).
- WELT, I. D. e WILHELMI, A. E., *Yale J. Biol. Med.*, **23**, 99 (1950).

- WILHELMI, A. E., «The Hypophyseal growth hormone, nature and actions», p. 59 (1955). Ed. Smith, R. W., Gaebler, O. H. e Long, C. N. H., New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- WILHELMI, A. E., FISHMAN, J. B. e RUSSEL, J. A., *J. Biol. Chem.*, **176**, 735 (1948).
- WINEGRAD, A. I., SHAW, W. N., LUKENS, F. D. W., STADIE, W. C. e RENOLD, A. E., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1922 (1959).
- WITTENBERG, J. e KORNBERG, A., *J. Biol. Chem.*, **202**, 431 (1953).
- YOUNG, F. G., *Biochem. J.*, **39**, 515 (1945).

ALGUNS PONTOS SINGULARES DA QUÍMICA ANALÍTICA (*)

A. HERCULANO DE CARVALHO

Na exposição que vou fazer, correspondendo ao amável convite dos meus consócios do Núcleo de Coimbra, proponho-me focar alguns assuntos do âmbito da Química Analítica, os quais, por circunstâncias várias, apresentam aspectos um pouco estranhos, por vezes desconcertantes.

Escolho-os ao acaso, de entre vários que, durante um período infelizmente para mim já bastante longo de ensino e prática dessa disciplina, me vêm à memória.

Desde já peço desculpa da sua heterogeneidade, conservando a esperança de, num ou noutro ponto, poder interessar os meus ouvintes,

Começarei por uma questão que está longe de ser nova, mas que me foi trazida à memória, há tempos, por um artigo assinado por Ringbom, do *Journal of Chemical Education* (**), com o título sugestivo de «O analista e as inconstantes constantes». Todos nós, que temos de ensinar aos estudantes a maneira como a Química-Física nos dá as bases para o tratamento de certas questões de Química-Analítica, fornecendo-nos expressões que a lei de acção de massa nos indica como «constantes», todos nós, digo, temos sentido que tal tratamento, com evidentes qualidades esclarecedoras e de sistematização, é por demais simplificado, sugerindo por isto conclusões nem sempre admissíveis.

O Autor do artigo a que me refiro dá nele exemplos impressionantes a tal respeito, como seja o do produto de solubilidade do sulfureto de mercúrio, SHg , cujo valor experimental é 10^{-52} , o que significaria que numa solução aquosa saturada desse composto existe um único par de iões em ... 170 !!

(*) Exposição feita no Núcleo de Coimbra da Sociedade Portuguesa de Química e Física.
(**) N.º de Julho de 1958.

Supondo que a solução contenha, como é o caso na prática, um excesso de iões sulfureto, a conclusão ainda será mais chocante. Assim, para um excesso correspondendo à solução deci-molar de SNa_2 , o volume contendo um par de iões seria equivalente ao de vários globos terrestres.

Passa-se certamente qualquer coisa que, na dedução da fórmula do produto de solubilidade, não foi prevista.

Admite-se, com efeito, que na fase líquida só poderiam existir os iões S^{-2} e Hg^{+2} , quando certamente (a enormidade daquela conclusão só por si o exige) as entidades presentes na solução devem ser vários iões complexos, como $(\text{SH})_2\text{Hg}$, S_2Hg^{-2} , etc. Aqui, como em muitos outros casos semelhantes, a simplicidade da hipótese da dissociação total tem de ser abandonada!

Mas, independentemente, do aspecto focado no artigo de Ringbom, também se verifica ensinarmos nós que as expressões dadas em função das concentrações das espécies iónicas variam com a força iónica das soluções e, ao darmos a noção de coeficientes de actividade, calculamos estes por uma expressão que não é válida, senão em soluções muito diluídas (lei limite de Debye e Hückel). Quer dizer, mesmo descontando o fenómeno da formação de iões complexos, as nossas fórmulas são inaplicáveis a grande número de casos reais, por exemplo, nas dosagens gravimétricas, quando a precipitação se faça com grande excesso de reagente ou em meio fortemente salino — condições frequentes na prática corrente.

Mesmo sob o ponto de vista qualitativo, podemos ser levados a fazer erros de previsão pois, baseados na lei limite, admitimos que os coeficientes de actividade decrescem com a força iónica quando é certo que, pelo menos para alguns iões, esses coeficientes voltam a aumentar quando a salinidade ultrapassa certos limites.

Temos assim de confessar que, apesar dos grandes progressos realizados na teoria, os nossos meios de previsão são ineficazes ainda numa extensa zona, onde se situam... quase todas as dosagens macro-gravimétricas!

Nas soluções diluídas, a formação de complexos e o efeito salino podem ainda considerar-se substituindo as constantes termodinâmicas pelas constantes chamadas «aparentes», «formais» ou, como parece preferir Kolthoff, «convencionais». Não nos resta outro remédio, mas como ficamos longe da simplicidade dos esquemas que nos apresentava a teoria clássica da dissociação electrolítica!

Vejamos alguns casos concretos, não já da teoria, mas da Química Analítica aplicada.

Não quero aqui repetir o que disse no Congresso de Lisboa da União Internacional de Química sobre a dosagem gravimétrica do ião sulfato, operação corrente mas cuja técnica continua a ser discutida

actualmente. Em resumo, a despeito duma prática já centenária, as melhores técnicas são ainda hoje aquelas que dão lugar a uma auto-compensação de erros... porque estes não são evitados por nenhuma delas. Para substituir esse velho método, ainda não apareceu nada melhor. Os próprios métodos volumétricos, incluindo a quelatometria, ou são mais trabalhosos ou ainda menos fiéis. Enfim, o exemplo não serve para envaidecer o químico-analista...

Outro tanto sucede com a dosagem dum outro ião, de importância prática também muito grande. Refiro-me ao alumínio. Em macro-análise a precipitação deste elemento no estado de hidróxido ou de sal básico, mesmo realizada em condições óptimas — nem sempre fáceis de conseguir — dá um precipitado de difícil lavagem, às vezes incompleto e cuja desidratação irreversível, exigida numa análise rigorosa, só se consegue a temperatura superior à máxima atingida pelos fornos ordinariamente usados para calcinações. Com o fim de melhorar a textura deste precipitado e evitar a sua peptização parcial, atenda-se ao sem-número de bases orgânicas e de aniões básicos inorgânicos que a literatura tem proposto para a separação do ião alumínio e isto nos dará ideia de dificuldade do problema.

Na escala de micro e de semi-micro-dosagem do mesmo ião, também se vão encontrar mais dezena de corantes orgânicos como base de métodos espectro-fotométricos... todos imperfeitos.

O assunto foi recentemente relatado na última sessão da nossa Sociedade, em Lisboa, pelos bolseiros do Centro de Química do I. S. T., D. Maria Cristina Baraona e Costa e Eng.º Carlos Moura Pulido.

De todos estes métodos o melhor (deveria dizer: o menos mau) é ainda o do «aluminon», mas todos os que o temos praticado conhecemos a sua infidelidade.

Voltando à macro-análise, a situação pode resumir-se com o seguinte exemplo: na análise dum silicato natural, quem dela tenha uma certa prática não tem razão para desconfiar dos resultados que obtém quanto à percentagem, nesse produto, da sílica, ferro, titânio, cálcio, magnésio, sódio, potássio e mesmo de elementos existindo geralmente em menores concentrações, como boro, fluor, manganês, enxofre, fósforo, lítio. Mas não pode olhar com igual confiança para o número que obteve para a alumina, substância que, muito frequentemente, constitui 20 % ou mais da amostra analisada. Estou talvez a enegrecer um pouco o quadro: na verdade cada analista tem a sua «mèsinha», perdoem-me a expressão, para conseguir (também aqui!) uma razoável compensação de erros... Mas estamos em pleno empirismo quanto à execução da dosagem. Quanto ao conhecimento das razões da sua dificuldade, o caso é diferente, o que nos dá esperança de poder vir a eliminá-la. Como é sabido, essas razões são, principalmente a circunstância do ião $[Al(OH)_6]^{-3}$ ser um ácido dando

origem, por neutralização, a aniões básicos e ao hidróxido $(OH)_3Al$ de carácter anfotérico, com uma zona de insolubilidade relativamente curta e de textura gelatinosa com tendência à peptização, volume específico elevado, pouco cómodo na filtração e dificilmente lavável. Por outro lado, como essa textura evolui rapidamente (costuma dizer-se «envelhece») no sentido de mais difícil solubilização nos ácidos, a técnica da dupla precipitação, ordinariamente tão eficaz para a purificação dos precipitados, torna-se de difícil aplicação. Finalmente como já fiz notar, o óxido O_3Al_2 é pronunciadamente higroscópico, a menos que seja calcinado a temperatura superior a 1.200° .

Dos métodos volumétricos para o alumínio, o mais atraente é também aqui a quelatometria indirecta com E. D. T. A.

Mas a despeito dos numerosos trabalhos publicados, onde se descrevem técnicas variadas, o método não me parece ainda maduro para entrar na prática corrente. Esperemos, no entanto, que assim possa ser brevemente.

Não só a teoria e as técnicas mas também a própria tarefa em si e as atitudes de quem a executa apresentam na Química Analítica aspectos singulares que merecem relevo.

Uma das características actuais do trabalho do analista é a deslocação evidente no sentido dos semi-micro e mesmo dos micro-métodos.

Se dermos à expressão «micro-análise» o significado não ortodoxo de «pesquisa e dosagem de componentes existindo em muito baixa concentração na amostra», verifica-se que as aplicações dessa modalidade de análise química tem aumentado vertiginosamente nos últimos anos.

Já de há muito sabíamos dosear vestígios de certas substâncias como o arsénio, o mercúrio, o fósforo, o óxido de carbono. São tóxicos violentos, muito em moda numa época que podemos chamar romântica, sem ofensa para o romantismo propriamente dito. E como os envenenamentos com eles eram frequentes, o engenho dos toxicologistas teve de descobrir os métodos para a sua detenção e dosagem em micro quantidades.

Ainda em nome da saúde pública, houve mais modernamente que estender as investigações a outras substâncias, também tóxicas, que a indústria, cada vez com mais intensidade, atira para a atmosfera e para os cursos de água: sulfídrico, sulfuroso, óxidos de azote, numerosos compostos orgânicos, etc.

Por outra via, foi ainda o progresso industrial que obrigou a estudar micrométodos para outras substâncias: as especificações de pureza dos produtos e das matérias-primas tornam-se cada vez mais exigentes e a determinação de teores da ordem de grandeza das partes por milhão e, até já, das partes por mil milhões, torna-se obrigatório em casos cada vez mais frequentes.

Ora as dosagens no domínio destas pequeníssimas concentrações não somente exigem técnicas delicadas mas impõem ao analista cuidados que não eram do âmbito da sua tarefa tradicional.

Já não são suficientemente puros os reagentes da qualidade «pró-análise» e toda a vidraria tem de ser cuidadosamente «desinfectada» ou mesmo substituída por material de plástico.

Quase se justifica para o químico uma formação de bacteriologista.

Dois exemplos, que darei a seguir, ilustram o grau de precauções a tomar em certos casos.

A dosagem do chumbo em alimentos onde o seu teor máximo admissível anda em volta de 10^{-6} (1 p.p.m.) exige, além de reagentes especialmente purificados e de vidraria especial, a ausência na sala de trabalho de canalizações de chumbo e de pinturas com tintas onde entrem compostos desse elemento.

No controle sanitário das instalações nucleares e nas pesquisas geoquímicas para urânio, recorre-se ao método fluorimétrico que permite fixar teores da ordem de grandeza de 10^{-9} .

O analista que executa estas dosagens não pode frequentar qualquer secção em que se manuseiem amostras de minério ou soluções de teor elevado de urânio.

Mais ainda: o fluorímetro e o pequeno forno de fusão de pastilhas não deve estar no laboratório. Sem estas precauções podem cometer-se erros de 1.000 % ou mesmo maiores, por contaminação, até pelos próprios dedos, bem lavados, do analista.

Conheço um caso em que houve que deslocar a aparelhagem de fluorimetria para a biblioteca do edifício e é caso para perguntar se, mesmo assim, os resultados não poderão ser falseados pela palavra «urânio» escrita nos livros...

As coordenadas da tarefa do químico-analista são sensivelmente diferentes quando se trata dum laboratório muito especializado ou de um laboratório onde se faz um pouco de tudo.

Em Portugal, com excepção de certos laboratórios de indústria e de um ou outro laboratório oficial, a especialização nunca é suficientemente avançada para que se possa beneficiar da automatização, quer do pessoal auxiliar quer da que já hoje se consegue com aparelhagem cuja aquisição só se justifica quando haja que fazer uma mesma operação em grandes séries.

Somos pois obrigados a gastar mais tempo, quer na análise, quer no estabelecimento prévio do seu esquema, quando se trate de casos novos que aparecem afinal com muita frequência. Após minuciosa consulta da bibliografia, há que praticar e re praticar os métodos seleccionados até poder dominá-los a ponto dos resultados nos merecerem confiança.

Ora acontece, também frequentemente, que ao executar todo esse trabalho nos interrogamos sobre a sua utilidade pois que a amostra recebida no laboratório é um simples fragmento, por exemplo dum minério, colhido à superfície e portanto longe de corresponder áquilo que se chama «amostra média».

Por princípio, o analista executa conscienciosamente o seu método, que escolheu por lhe parecer mais rigoroso e mais sensível, esmerando-se na sua aplicação e trabalhando pelo menos em duplicado. Mas, para quê tantos cuidados se a composição da amostra em causa se pode afastar grandemente da composição média, a única que pode efectivamente ser útil?

É, como disse, uma questão sagrada de princípio, pois é da ética da profissão fazer o melhor que se sabe. Mas confrange-nos a inutilidade de tanto trabalho pois, como costuma dizer-se sensatamente: os resultados duma análise não podem valer mais do que amostra sobre a qual incide.

Quantas vezes isto se explica ao portador duma pedra, apanhada ao acaso em qualquer sítio, sem convencê-lo a desistir duma análise quantitativa que pretende!

Apesar de habituais, estes casos continuam a fazer-me impressão, também por saber que o boletim analítico irá ser exibido como representando a composição de toda uma zona mineralizada e, como tal, poderá ser aceite por outros, isto com boa-fé e santa ignorância de ambas as partes!

Esta crença no poder mágico e dogmático duma análise é, para o químico-analista, tanto ou mais perturbante do que a atitude oposta, a qual também não é muito rara: a desconfiança nos resultados quando estes discordam das previsões ou palpites do interessado, por este convertidas em certezas. «Esta análise não pode estar certa porque a amostra deve ter tanto por cento do elemento tal», eis uma frase que se escuta de vez em quando, mesmo da parte de pessoas responsáveis. Ela é muitas vezes injusta mas tem a sua desculpa. Por exemplo, tratando-se dum produto fabricado, parece muito menos grave admitir um erro de análise do que um erro na produção. Como consideramos pecado venial ter um engano na escala dos miligramas, com ele estamos sempre prontos a desculpar os grandes pecados mortais, isto é, os da escala das toneladas.

Esses são desagradáveis condicionamentos exteriores da nossa tarefa.

Mas no próprio centro da sua actividade, o químico-analista tem contrariedades constantes e não pode relaxar, nem momentaneamente, um tenso estado de alerta. Os alçapões espreitam-no a cada passo. Já nem falo de problemas novos, mas do dia-a-dia.

Há, por vezes, uma série de circunstâncias que quase diabòlicamente se somam e conjugam de tal maneira que convidam à superstição.

Lembro-me neste momento dum desses casos, passado no Laboratório do Instituto Superior Técnico, que chama a atenção para o princípio de que o esquecimento de qualquer preceito, por muito trivial que pareça, pode conduzir a conclusões inesperadas e falsas. O preceito, aqui, é comestivo mas sagrado: não deve começar-se a preparação, para a análise, dum amostra sem primeiro... olhar para ela. A prática é de tal maneira terra-a-terra que sentimos a necessidade de dignificá-la com título um pouco enfático: exame macroscópico da amostra. Tratava-se da análise completa dum amostra de chumbo muito puro. Num laboratório devidamente especializado, o problema resolvia-se rápida e elegantemente por espectroscopia quantitativa, de preferência com o quantómetro. Quimicamente há que dissolver uma amostra grande (10-20 g) e, com repetidas técnicas de separação, isolar e dosar impurezas dum ordem de grandeza inferior a 0,1 % e mesmo a 0,01 %. No caso que lhes conto, tudo correu bem até ao isolamento do ferro e do alumínio. Aqui apareceu uma anomalia, porque os hidróxidos apresentavam volume exagerado e cor arroxeadas. Verificámos que se tratava de crómio em quantidade apreciável. Ora o chumbo puro do comércio não tem essa impureza. Mas o duplicado da análise comportava-se idênticamente, não restando pois dúvidas sobre a existência do crómio. Era desconcertante!

Procedendo a averiguações, verificou-se que a chapa de chumbo remetida para análise provinha dum ânodo de cromagem e apresentava à simples vista, manchas superficiais de cromato que deveriam ter sido previamente limpas!

Em resumo: quem dera entrada à amostra limitara-se a ler... incompletamente, a carta de remessa, sem abrir a caixa que continha a amostra, e o funcionário que habitualmente faz a sua preparação para análise tinha sido, por motivo fortuito, substituído por outro, o qual não se lembrou de chamar a atenção do analista para aquelas nódoas amarelas, difíceis de notar depois da redução da chapa a pequenas aparas. Por sua vez — e esta é que é a parte mais grave — o analista esquecera-se do tal exame macroscópico obrigatório, antes de se começar a preparação da amostra para análise!

Deste mesmo esquecimento já tem resultado iniciar-se a análise dum calcário pela fusão com CO_3Na_2 ... só porque o remetente lhe chamou «feldspato», confusão esta mais frequente do que se julga.

Referi-me há pouco ao poder mágico que os leigos frequentemente dão ao resultado dum análise.

Mas o próprio analista tem, sem querer, superstições perigosas.

Aponto apenas um exemplo: o arrefecimento dum precipitado, após a calcinação, num exsicador, é automaticamente considerado como prática infalível para evitar a sua re-hidratação. Ora quantas vezes a substância usada no exsicador já tem o seu poder dissecante esgotado ou, pelo menos, muito diminuído!

Dois factos que ainda lhes vou contar ilustram outro aspecto da vida do químico-analista que tenha de fazer análises para o público. A miúdo lhe surgem problemas que dizem respeito ao fôro e esta circunstância exigiria uma coisa que não é vulgar: que do lado do perito e do lado do jurista existisse compreensão mútua de natureza real das suas tarefas.

Um dos factos passou-se comigo e dele tenho de me penitenciar.

Andava uma questão em julgado sobre amostras de tintas, que o fornecedor garantia não terem chumbo. Estava eu nos meus primeiros tempos de analista e fui encarregado de fazer a análise. Fiz um exame analítico o mais minucioso possível e, empregando as reacções mais sensíveis daquele elemento, encontrei, numa das amostras, ténues vestígios de chumbo. Encontrei e escrevi o que encontrei no relatório da análise. Não se pode dizer que não tenha sido consciencioso. Mas não fui sensato, porque a ordem de grandeza encontrada para a concentração do chumbo, significava, para o caso em questão, ausência deste metal. A ordem de grandeza em causa era, pelo menos, cem vezes maior! Para explicar isto, o advogado teve, por minha culpa, que dispendir grande soma de oratória.

Isto porque, do outro lado, também geralmente se ignoram as coordenadas do nosso campo de trabalho, como o mostra o segundo facto. Não se passou este comigo mas foi-me relatado por quem a ele assitiu.

Foi durante o período da última guerra, num julgamento em que estavam em causa umas amostras de minério de volfrâmio. A certa altura um dos advogados exibiu perante o juiz duas análises feitas em laboratórios diferentes duplicados dessas amostras. Os resultados eram, respectivamente, 64,75 % e 64,70 % de WO_3 . Conclusão do magistrado: não pode tratar-se da mesma amostra, senão os resultados seriam *iguais*. Aparece neste exemplo um abismo escancarado entre dois conceitos de igualdade!

Mas já fatiguei demasiadamente os meus ouvintes e vou finalizar com um último exemplo, que costumo citar aos meus alunos e que incita à prática duma virtude também essencial ao químico-analista: a humildade perante as limitações das suas possibilidades. É sabido como as reacções «de toque», sobretudo com os reagentes orgânicos, permitem hoje a pesquisa e identificação de elementos em concentrações mínimas. Sentimos a tentação de nos envaidecer com

a extrema sensibilidade dessas reacções, que atingem vulgarmente limites de identificação de 10^{-6} a 10^{-7} g, isto é, 1 a 0,1 μg , na toma.

Ultrapassando largamente esse limite, cita a bibliografia, uma ultra-micro-reacção para o ouro, em que se aproveita o poder catalítico deste elemento na oxidação de Mn^{+II} a Mn^{+IV} . A reacção tem limites de identificação de 10^{-7} μg , quer dizer, é mais de um milhão de vezes mais sensível que as reacções de toque habituais. É realmente maravilhoso!

Façamos agora as contas ao número de átomos correspondente a esse quase imponderável. Encontra-se um valor um pouco superior a ... 300 milhões de átomos.

Quer dizer, a reacção química mais sensível que hoje se conhece exige a presença dum número quase astronómico daquelas partículas fundamentais do químico.

E trata-se duma sensibilidade excepcional: nos ensaios correntes, serão precisos 300 milhões de milhões de átomos para que possamos atestar a existência duma espécie química.

Podemos, em boa verdade, dizer que a unidade normalmente acessível ao analista é ...o bilião de átomos!

Eis uma verificação que dissipará qualquer assomo de vaidade quanto à sensibilidade dos nossos próprios métodos. É certo que o aperfeiçoamento da Radioquímica, em especial do seu método de activação com neutrões, alargou de modo espectacular as fronteiras do nosso domínio, tanto na detecção como na dosagem... mas poder-se-á dizer ainda que se trata de Química Analítica?

Ao terminar esta exposição, de cuja heterogeneidade peço, mais uma vez, desculpa, diz-me a consciência que os meus ouvintes, aos quais aliás não teria a pretensão de dar novidades, me poderão acusar de pèssimista. Só falei em dificuldades e defeitos da Química Analítica.

A minha defesa contra tal suspeita é afinal a circunstância de estar a falar a um auditório esclarecido e não a leigos. Citei um pequeno número de casos ou de aspectos ingratos. Mas V. Ex.^{as} sabem bem que essas singularidades aparecem e avultam precisamente pelo contraste com o enorme progresso realizado nos últimos tempos, o qual, se ainda não foi bastante para solucionar as questões citadas, já resolveu um sem-número de outras dificuldades que nos preocupavam dantes.

Se esta minha ligeira exposição despertou em alguns dos meus ouvintes o desejo de contribuir para o esclarecimento dos problemas analíticos que referi, dar-me-ia por satisfeito, pois não terá sido totalmente inútil o tempo que lhes roubei.

ESTATUTOS DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA E FÍSICA

Aprovados em Assembleia Geral de 28 de Junho de 1926

CAPÍTULO I

Fins, sede e ano social

ARTIGO 1.º — A Sociedade Química Portuguesa, tendo anexa uma secção de Física, passa a denominar-se SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA E FÍSICA.

ARTIGO 2.º — A Sociedade Portuguesa de Química e Física que abrangerá uma secção de Química e uma secção de Física, terá a sua sede central em Lisboa e ficará constituída por três núcleos funcionando em Lisboa, Porto e Coimbra.

ARTIGO 3.º — A Sociedade Portuguesa de Química e Física terá por objectivo radicar, cultivar e desenvolver em Portugal o estudo da Química, da Física e das ciências com estas mais directamente relacionadas.

Para conseguir este fim, a Sociedade Portuguesa de Química e Física:

- a) realizará sessões científicas periódicas ordinárias e extraordinárias;
- b) publicará uma revista científica dando conta de trabalhos relativos à química, à física e ciências congéneres;
- c) procurará organizar e manter uma biblioteca com um gabinete de leitura em cada núcleo, realizando entre os diversos núcleos a troca necessária de livros ou publicações;
- d) pôr-se-á em contacto com sociedades científicas nacionais e estrangeiras.

ARTIGO 4.º — O ano social começará em 1 de Janeiro.

CAPÍTULO II

Sócios

ARTIGO 5.º — Os membros da Sociedade serão:

- a) *Sócios honorários*;
- b) *Sócios beneméritos*;
- c) *Sócios efectivos* (compreendendo os *fundadores*);
- d) *Sócios correspondentes*;
- e) *Sócios agregados*;

Serão *sócios honorários* os indivíduos aos quais, pela sua categoria científica ou méritos acerca das ciências química e física, a Sociedade, com o assentimento dos seus núcleos, entenda dever conferir esta prova de consideração. O seu número não deve exceder dez.

Serão *sócios beneméritos* todos os indivíduos que à Sociedade prestem serviços relevantes.

Serão *sócios efectivos*, além dos *fundadores*, todas as pessoas residentes em Portugal que a Sociedade elege mediante apresentação de trabalhos científicos, de provas de terem contribuído para o desenvolvimento da química e da física, ou por proposta fundamentada da direcção.

Serão *sócios correspondentes* os estrangeiros que a Sociedade elege mediante apresentação dos títulos mencionados na alínea anterior.

Serão *sócios agregados* os estudantes portugueses que se interessarem pelo estudo da química, da física e ciências congéneres.

O número de sócios beneméritos, efectivos, correspondentes e agregados não será limitado.

§ ÚNICO — Os sócios da Sociedade Química Portuguesa passarão a sócios da mesma categoria da Sociedade Portuguesa de Química e Física.

ARTIGO 6.º — A admissão de sócios efectivos, correspondentes e agregados poderá ser solicitada pelo próprio interessado e abonada por dois sócios efectivos em pleno uso dos seus direitos, ou por proposta directa de dois sócios.

Os sócios agregados poderão também ser abonados por dois sócios da mesma categoria.

§ 1.º — A eleição será realizada na primeira sessão ordinária depois da proposta ter sido entregue ao Conselho de Direcção do Núcleo a que o interessado deseja pertencer por intermédio de qualquer dos seus membros.

§ 2.º — A eleição é por simples maioria dos sócios presentes.

ARTIGO 7.º — Os sócios efectivos e correspondentes pagarão uma quota anual de 36\$00.

Os sócios agregados pagarão uma quota anual de 10\$00, sem direito ao Boletim ou outras publicações da Sociedade ou 36\$00 com direito aos mesmos.

Os sócios honorários e beneméritos são isentos de quota.

§ ÚNICO — Os sócios que não pagarem as suas quotas até ao fim de Janeiro de cada ano serão avisados uma vez por carta simples e passados quinze dias por carta registada. Se não satisfizerem o seu débito até ao fim de Fevereiro serão considerados demissionários; querendo ser readmitidos terão de satisfazer primeiro o seu débito.

ARTIGO 8.º — Os sócios honorários, efectivos e correspondentes, terão o direito de receber o Boletim e mais publicações da Sociedade, de assistir às sessões, de tomar parte nas discussões científicas.

§ 1.º — Não têm voto deliberativo nem podem fazer parte dos corpos gerentes os sócios correspondentes.

§ 2.º — Os sócios agregados não têm direito ao Boletim ou publicações da Sociedade, salvo se se collocarem nas condições exaradas no artigo 7.º, e só poderão ser eleitos para o cargo de 2.ºs Secretários dos Núcleos.

CAPÍTULO III

Sessões

ARTIGO 9.º — As sessões científicas ordinárias realizar-se-ão mensalmente no núcleo da sede da Sociedade e nos núcleos do Porto e Coimbra, nos dias fixados no princípio de cada ano e publicados no primeiro número anual do Boletim da Sociedade.

§ ÚNICO — Nos meses de Agosto e Setembro não há sessões.

ARTIGO 10.º — Além das sessões ordinárias poder-se-ão realizar sessões científicas extraordinárias por deliberação da Direcção do núcleo.

ARTIGO 11.º — Haverá no fim do mês de Dezembro de cada ano uma sessão administrativa para apresentação *das contas e relatório da Direcção*, eleição dos corpos gerentes para o ano seguinte e discussão de propostas de ordem administrativa.

§ ÚNICO — Quando a Direcção julgar necessário, ou quando dez sócios efectivos na plena posse dos seus direitos o requisitarem, poder-se-ão efectuar sessões administrativas extraordinárias.

ARTIGO 12.º — Para as sessões administrativas a que se refere o artigo anterior e para todas as sessões ordinárias e extraordinárias será enviado a cada um dos sócios residentes na cidade do núcleo considerado, com três dias de antecedência pelo menos, um aviso

convocatório, no qual serão declarados o local, dia e hora de sessão e ordem do dia.

ARTIGO 13.º — Às sessões administrativas deve assistir, pelo menos, a terça parte dos sócios efectivos; não havendo número realizar-se-á segunda sessão que só poderá ter lugar três dias depois, pelo menos, do dia mencionado nos avisos convocatórios.

§ 1.º — Estes avisos poderão desde logo designar o dia eventual da segunda sessão.

§ 2.º — A segunda sessão poderá funcionar com qualquer número de sócios presentes.

ARTIGO 14.º — As deliberações administrativas serão tomadas por simples maioria de sócios presentes, salvo as que se referirem à alteração dos estatutos ou à dissolução da Sociedade que devem ser tomadas por mais de dois terços dos sócios presentes.

CAPÍTULO IV

Fundos

ARTIGO 15.º — Os fundos da Sociedade serão constituídos:

- a) pelas quotas dos sócios;
- b) pelo produto da venda das suas publicações;
- c) por subsídios do Estado ou quaisquer donativos.

§ ÚNICO — A maior parte dos fundos disponíveis será depositada no Banco de Portugal ou na Caixa Económica Portuguesa, podendo levantar-se em parte ou totalmente por meio de cheques assinados pelo tesoureiro da Sociedade e pelo presidente do Núcleo a que ele pertença.

CAPÍTULO V

Administração

ARTIGO 16.º — O Conselho de Direcção (científico e administrativo) de cada núcleo será composto de:

- Um Presidente.
- Dois Vice-presidentes.
- Um primeiro Secretário.
- Um segundo Secretário.
- Três vogais efectivos e três substitutos.

§ 1.º — O presidente ou um dos vice-presidentes deverá ser um membro da secção de Física.

§ 2.º — O segundo secretário poderá ser um sócio agregado.

§ 3.º — O primeiro secretário do núcleo onde se publicar a Revista desempenhará os funções de bibliotecário da Sociedade.

§ 4.º — Os membros da Direcção serão eleitos anualmente na sessão administrativa do mês de Dezembro, por simples maioria dos sócios presentes.

§ 5.º — A gerência dos membros da Direcção é pelo período de um ano, podendo porém ser reeleitos.

§ 6.º — No caso de não recondução, a eleição do presidente dos núcleos deverá recair em um dos vice-presidentes, devendo ser presente o preceituado no § 1.º deste artigo.

ARTIGO 17.º — Haverá na sede um Conselho Geral da Sociedade, que será constituído pelo presidente, os dois Secretários e os vogais do núcleo da sede, por os presidentes dos dois outros núcleos, por um tesoureiro e por um bibliotecário.

O tesoureiro fará parte e será eleito por o núcleo onde for publicada a Revista.

O bibliotecário será o indicado no § 3.º do artigo 16.º.

ARTIGO 18.º — O Conselho Geral da Sociedade deverá reunir pelo menos uma vez por semestre para se ocupar dos interesses científicos e económicos da Sociedade, podendo reunir extraordinariamente à requisição de qualquer núcleo.

As deliberações tomadas devem ser publicadas no Boletim da Sociedade.

§ 1.º — Às sessões do Conselho Geral deverá assistir ou fazer-se representar a maioria dos seus membros.

§ 2.º — A convocação para estas sessões será feita, a todos os membros, pelo Secretário, com oito dias pelo menos de antecipação.

ARTIGO 19.º — Ao presidente de cada núcleo compete:

1.º — Presidir às reuniões da Direcção, fixar a ordem dos trabalhos e dirigir as discussões em todas as sessões tanto científicas como administrativas.

2.º — Dar execução às deliberações da Direcção administrativa na parte referente ao seu núcleo.

3.º — Representar o núcleo da Sociedade, perante as autoridades Administrativas e judiciais, e em todos os actos de representação local.

4.º — Nomear e demitir os empregados que possa haver no respectivo núcleo.

ARTIGO 20.º — Ao primeiro secretário compete convocar as sessões do Núcleo, a redacção e publicação das actas das sessões, promover a publicação dos trabalhos científicos apresentados e a correspondência, no que poderá ser auxiliado pelo segundo secretário.

Mais particularmente competirá ao segundo secretário a correspondência de núcleo para núcleo e tudo o que se relacione com o movimento do núcleo e propaganda da Sociedade.

ARTIGO 21.º — Aos vogais competirá a assistência às sessões da direcção e a cooperação em todos os actos da mesma.

ARTIGO 22.º — O Presidente será substituído na sua falta ou impedimento por um dos vice-presidentes e na falta destes pelo 1.º Secretário.

ARTIGO 23.º — Ao Presidente do Conselho Geral da Sociedade, que será escolhido entre os três presidentes, compete independentemente das suas funções de presidente do Núcleo:

1.º — Representar a Sociedade em todos os actos de carácter nacional e internacional.

2.º — Presidir às sessões do Conselho Geral.

3.º — Comunicar aos núcleos as decisões do mesmo Conselho.

Aos secretários compete a redacção das actas e de toda a correspondência que diga respeito ao Conselho Geral e às suas diversas relações.

ARTIGO 24.º — Ao tesoureiro geral da Sociedade competirá receber toda a receita, efectuar os pagamentos aprovados pelos núcleos, mediante requisição assinada pelo presidente e pelo secretário.

§ ÚNICO — Nos núcleos onde não exista tesoureiro, um dos secretários, poderá auxiliar o tesoureiro geral na cobrança local.

ARTIGO 25.º — Ao secretário servindo de bibliotecário competirá:

1.º — Organizar e manter em boa ordem o arquivo e a biblioteca da Sociedade;

2.º — Manter-se em constante ligação com os outros núcleos;

3.º — Responder a qualquer consulta que lhe seja feita pelos sócios.

ARTIGO 26.º — Os núcleos do Porto e Coimbra comunicarão à sede da Sociedade as suas resoluções, resumo de comunicações e sócios eleitos.

§ ÚNICO — O núcleo de Lisboa (sede da Sociedade) comunicará ao núcleo onde se publicar o Boletim, todo o movimento da Sociedade.

CAPÍTULO VI

Publicações

ARTIGO 27.º — A Sociedade adoptará como seu Boletim a «Revista de Química Pura e Aplicada». Nesta revista, cujo número de páginas é ilimitado, serão insertas as actas das sessões ordinárias e extraordinárias e das sessões das direcções, os trabalhos apresentados pelos sócios e os resumos dos trabalhos científicos publicados em outros lugares, assim como comunicações que interessem aos sócios sob o ponto de vista científico e social.

§ ÚNICO — A Sociedade fará, além desta, as publicações que julgue convenientes.

ARTIGO 28.º — A direcção da Revista pertence aos corpos gerentes dos três núcleos da Sociedade.

ARTIGO 29.º — A Comissão de redacção e a parte administrativa ficará a cargo do núcleo onde ela se publicar.

ARTIGO 30.º — Todos os sócios nas condições dos artigos 7.º e 8.º receberão gratuitamente as publicações da Sociedade.

ARTIGO 31.º — A todos os sócios que fizerem comunicações científicas serão dadas gratuitamente separatas simples dos seus trabalhos se as condições financeiras assim o permitirem.

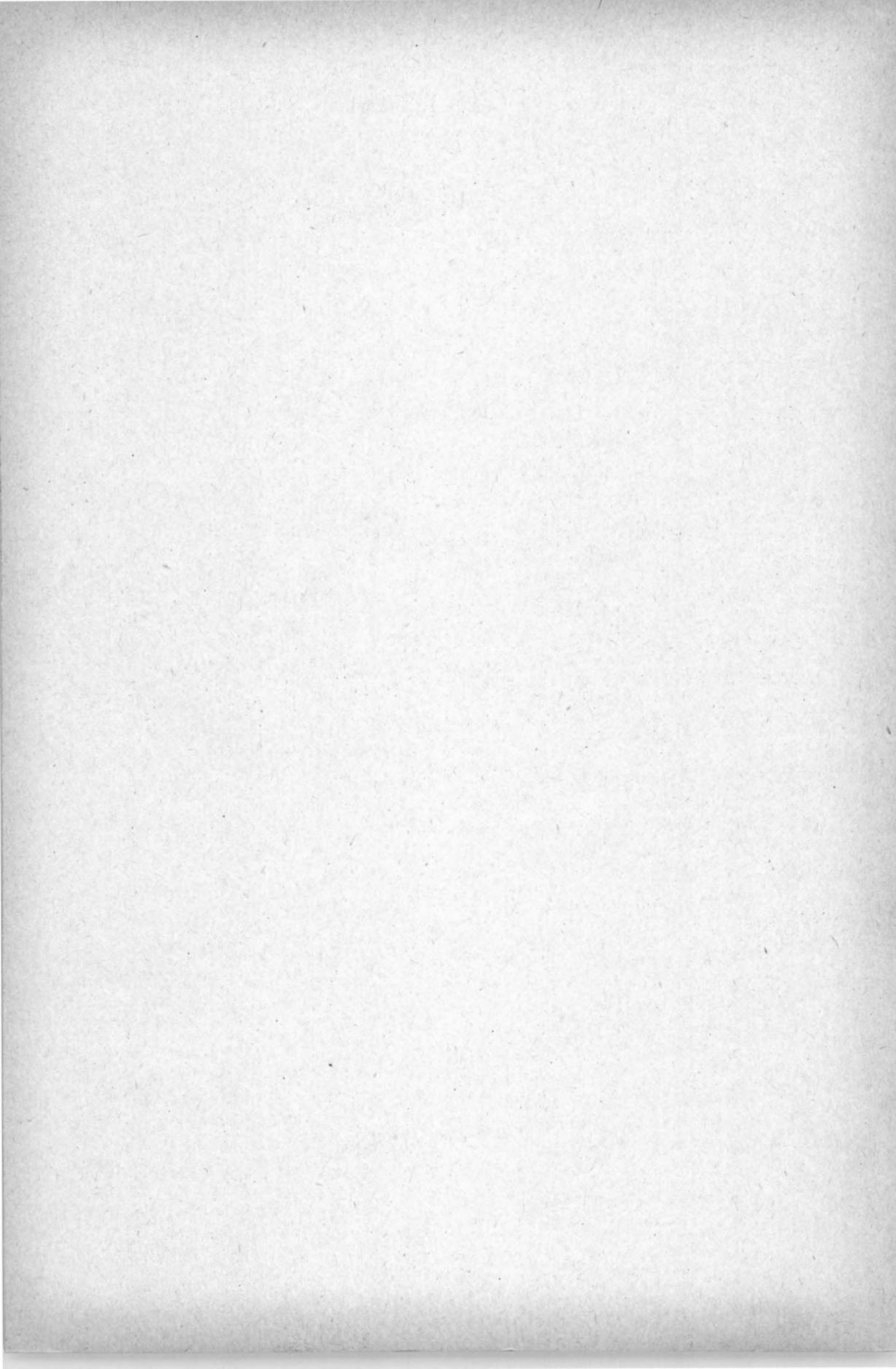
§ ÚNICO — O número de separatas a fornecer será fixado pela Comissão Administrativa.

CAPÍTULO VII

Disposições gerais

ARTIGO 32.º — Os presentes estatutos só depois de um ano poderão ser alterados por proposta da Direcção de um Núcleo ou de um terço dos sócios efectivos, sendo as alterações propostas discutidas em sessões especialmente consagradas a este fim, observando-se o preceituado nos artigos 13.º e 14.º.

ARTIGO 33.º — Dada a dissolução da Sociedade, o espólio, depois de pagar as dívidas, reverterá a favor da Fazenda Nacional, nos termos do artigo 36.º do Código Civil.



Composto e impresso nas Oficinas Gráficas de
RAMOS, AFONSO & MOITA, LDA.
Rua de «A Voz do Operário», 8 a 16 - S. Vicente de Fora
LISBOA