

ENSAIO BIOLÓGICO DE PREPARAÇÕES DIGITÁLICAS (*)

JOSÉ RIBEIRO DO VALLE (**)

JOSÉ LEAL PRADO (***)

A pedido do Dr. H. Sampaio Corrêa, então Diretor Geral do Departamento de Saúde do Estado, iniciamos, em 1956, neste Setor, o ensaio de preparações digitálicas visando à análise fiscal subsequente de preparados cardioativos apreendidos pelo Serviço de Fiscalização do Exercício Profissional (****).

Uma vez escolhido o método biológico, baseado na toxicidade para o pombo, oficial nas Farmacopéias internacional de 1951, inglesa de 1953 e norte-americana de 1955 (U.S.P. XV), e estabelecidas, com algumas modificações, as condições de realização da prova, aproveitamos a oportunidade para resumir as observações e os resultados aqui descritos e tecer a propósito comentários julgados de interesse.

MATERIAL E MÉTODO

Fizemos, no decorrer deste trabalho, ensaios biológicos em pombos empregando as seguintes preparações:

- a) *Pó padrão de folhas de Digital*, U.S.P. 1942, distribuído pelo "Board of Trustees of the U.S.P. Convention, Inc.", em ampola selada, devidamente conser-

(*) Trabalho dos Laboratórios de Farmacologia e Bioquímica da Escola Paulista de Medicina e da Seção de Fisiologia Aplicada (Divisão de Bromatologia e Química) do Instituto Adolfo Lutz, realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

(**) Professor Catedrático de Farmacologia na Escola Paulista de Medicina e Médico do Instituto Adolfo Lutz.

(***) Professor Catedrático de Bioquímica na Escola Paulista de Medicina e Médico do Instituto Adolfo Lutz.

(****) Os primeiros dados sobre o assunto constam do Relatório Oficial n.º 5, de 3 de Dezembro de 1956, deste Setor, apresentado ao Sr. Dr. Ariosto Büller Souto, Diretor do Instituto Adolfo Lutz.
Recebido para publicação em 10 de abril de 1959.

vada neste Instituto. A atividade do pó empregado correspondia, convencionalmente, a 1 unidade U.S.P. ou internacional em 100 mg, i. é., 10 u.i., por grama, de pó.

- b) *Digitalinum* B.D.H., mistura de glicosídeos digitálicos, adquirida da British Drug House, de Londres, tomado como Padrão secundário para os preparados à base de pó de fôlhas ou de mistura de glicosídeos.
- c) *U.S.P. Digitoxin Reference Standard*, distribuído, também, pelo "Board of Trustees of the U.S.P. Convention, Inc."
- d) *Digitoxin*, Merck, tubo fechado de 100 mg, tomado como padrão secundário para os preparados à base de digitoxina ou digitalina.
- e) *Digalen* — *Substanz* Gen. — Mg 1955, gentilmente fornecido pela F. Hoffmann — La Roche & Cia.

Recebemos, neste setor, para análise fiscal, 58 amostras de preparados digitálicos de diferentes firmas nacionais e estrangeiras. Salvo algumas exceções, amostras recebidas de mesmo nome comercial correspondiam à diferente forma farmacêutica ou à diferente partida de fabricação. Dentre essas 58 amostras apreendidas, 28 eram à base de glicosídeo puro da *Digitalis purpurea*, 12 à base de mistura de glicosídeos de *D. purpurea* ou da *D. lanata* e 18 à base de pó de fôlhas da *D. purpurea*. Dentre as 28 amostras de preparados à base de digitoxina ou digitalina, 8 foram analisadas biologicamente e as demais o foram quimicamente, conforme o processo colorimétrico descrito na U.S.P. XIV (1950), pág. 181. Os 30 preparados, à base de mistura de glicosídeos ou obtidos do pó de fôlhas de dedaleira, foram analisados biologicamente.

As preparações referidas nos itens *a* — *e* e os preparados sob a forma de comprimidos eram previamente extraídos, por agitação, durante 24 horas, à temperatura do Laboratório, com etanol a 80%. Os preparados, sob a forma líquida para uso oral ou sob a forma parenteral, eram simplesmente diluídos em salina heparinizada no momento do ensaio. O tempo entre a extração e a diluição para a prova biológica não foi superior a 30 dias. Entrementes os extratos eram conservados no refrigerador, em vidro escuro, a + 5° C.

É a seguinte a técnica do ensaio em pombos adotada rotineiramente neste setor:

1) ANIMAIS

Empregam-se pombos adultos, de ambos os sexos, em condições aparentes de boa saúde, adquiridos em São Paulo de fornecedores do Instituto. De acôrdo com a recomendação da U.S.P. XV (1955), pág. 213, o pêso do pombo mais pesado não deve exceder a duas vêzes o pêso do pombo mais leve. Os animais são marcados, pesados de véspera e no dia do ensaio, deixados sem alimento, não sem água, durante cêrca de 20 horas.

2) ANESTESIA

As Farmacopéias inglêsa e norte-americana preconizam o emprego do éter como anestésico na dose apenas necessária para *tranquilizar* os pombos. Achamos mais conveniente e mais prático seguir a recomendação de HOLCK (1951), e usar o pentobarbital sódico (Nembutal), em solução salina a 1%, injetada na musculatura peitoral, na dose de 30 mg/kg.

3) CONTENÇÃO

Uma vez anestesiados superficialmente os pombos, em 2 grupos de 6 ou 7 animais, para o ensaio concomitante da solução desconhecida e da solução padrão, são êles contidos numa prancha de madeira, presos pelas asas graças a tabuinhas fixadas por dobradiças e borboletas conforme se vê nas figs. 1 e 2. Esta prancha de



Fig. 1 — Pombos anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) presos pelas asas e pela cauda em prancha apropriada.



Fig. 2 — Injeção endovenosa da solução a ensaiar, através de tubo de polietileno.

contenção, para 3 ou 6 pombos, e que pode ser colocada em cima da mesa do laboratório, foi adaptada do modelo descrito por FISHER & SUTOL (1950).

4) INJEÇÕES

Após dissecação da veia da asa e introdução de agulha montada em tubo plástico de polietileno, p. ex. *Adams PE 50*, e o grupo de animais devidamente preparado, iniciam-se as injeções endovenosas da solução a ensaiar, no volume de 1 ml/kg, com intervalo de 5 minutos entre uma e outra, repetidas até a morte do animal.

5) SOLUÇÕES ENSAIADAS

A solução padrão e a desconhecida, usadas dentro de 30 dias de preparação, são diluídas, no dia do ensaio, em salina heparinizada (0,2 ml de heparina em 100 ml de NaCl a 0,9%). Nas condições habituais, a diluição final do padrão correspondente a 0,075 u.i./ml, e no volume de 0,2 a 0,3 ml por injeção, mata o pombo em tórno da 14.^a dose.

Considera-se válido o ensaio quando a média das injeções letais fica compreendida entre a 12.^a e a 20.^a doses.

RESULTADOS

Os dados sobre a toxicidade, para o pombo, das preparações $\alpha - e$, nos diferentes ensaios realizados vêm resumidos na Tabela 1.

A média geral e o erro padrão da média de 4 ensaios com o pó padrão de folhas de digital foi de $124 \pm 5,7$ mg/kg. São necessários, portanto, de 118 a 130 mg, isto é, de 1,18 a 1,30 unidades internacionais, em nossas condições experimentais, para matar 1 kg de pombo.

Para o *Digitalinum* a toxicidade média encontrada foi de $6,3 \pm 0,3$ mg/kg, aproximadamente 19,5 vezes mais ativo do que o pó padrão. A comparação inicial da toxicidade de ambas as preparações, deduzida do ensaio contemporâneo de 14-6-1957, mostrou a relação de 115:6,9, praticamente 16,5. Este foi o fator levado em conta nas análises fiscais quando empregávamos o *Digitalinum* como preparação de referência.

O *Digaleno*, em substância, foi cerca de 50 vezes mais tóxico do que o pó padrão e 2,5 vezes mais tóxico do que o *Digitalinum*. Não se observou diferença significativa na toxicidade para o pombo entre a Digitoxina padrão ($0,52 \pm 0,04$ mg/kg) e a *Digitoxina* Merck ($0,56 \pm 0,04$ mg/kg), tomada como padrão secundário.

TABELA I

ENSAIO BIOLÓGICO EM POMBOS DE VÁRIAS PREPARAÇÕES "DIGITALIS"

Data do ensaio	Número do ensaio	Solução ensaiada	Número de pombos usados	Média do número de injeções letais	Dose letal média e desvio padrão (mg/kg)
PÓ PADRÃO DE FOLHAS DE DIGITAL (U.S.P. 1942)					
4- 6-57	I	10 mg/ml	7	13,4	133 ± 16
5- 6-57	II	9 mg/ml	7	13,3	118 ± 14
12- 6-57	III	9 mg/ml	7	14,1	131 ± 27
14- 6-57	IV	9 mg/ml	7	12,4	115 ± 19
Média geral e erro padrão					$124 \pm 5,7$ mg/kg
DIGITALINUM BDH (PADRÃO SECUNDÁRIO)					
14- 6-57	I	0,545 mg/ml	7	12,6	$6,9 \pm 1,1$
27- 3-58	II	0,485 mg/ml	7	12,6	$6,1 \pm 1,3$
9- 6-58	III	0,454 mg/ml	7	14,0	$6,5 \pm 1,0$
14- 8-58	IV	0,454 mg/ml	6	13,0	$6,1 \pm 0,5$
23-12-58	V	0,454 mg/ml	7	14,0	$6,2 \pm 1,1$
15- 4-59	VI	0,454 mg/ml	6	12,7	$5,8 \pm 0,7$
16- 4-59	VII	0,454 mg/ml	7	13,9	$6,2 \pm 1,3$
19- 5-59	VIII	0,454 mg/ml	7	13,6	$6,3 \pm 0,7$
Média geral e erro padrão					$6,3 \pm 0,3$ mg/kg

Data do ensaio	Número do ensaio	Solução ensaiada	Número de pombos usados	Média do número de injeções letais	Dose letal média e desvio padrão (mg/kg)
<i>DIGALENO</i> (Subs. Gen. Mg. 1955)					
19- 5-59	I	0,128 mg/ml	7	18,3	2,3 ± 0,3 mg/kg
<i>DIGITOXINA</i> (U.S.P. — STANDARD)					
14-11-56	I	0,034 mg/ml	5	13,2	0,48 ± 0,15
20-11-56	II	0,028 mg/ml	6	20,0	0,56 ± 0,07
22-11-56	III	0,032 mg/ml	7	16,6	0,55 ± 0,07
29-11-56	IV	0,032 mg/ml	6	15,3	0,48 ± 0,06
Média geral e erro padrão					0,52 ± 0,04 mg/kg
<i>DIGITOXINA MERCK</i> (PADRÃO SECUNDÁRIO)					
—	I	0,038 mg/ml	7	15,9	0,60 ± 0,09
20-11-56	II	0,038 mg/ml	7	14,2	0,51 ± 0,04
—	III	0,038 mg/ml	5	14,6	0,55 ± 0,01
28- 3-58	IV	0,038 mg/ml	7	14,7	0,56 ± 0,06
16- 5-58	V	0,038 mg/ml	7	15,4	0,57 ± 0,08
Média geral e erro padrão					0,56 ± 0,04 mg/kg

Entre os preparados analisados à base de glicosídeos puros, somente num caso o produto estava em desacordo com a atividade rotulada. Tratava-se da forma, em comprimidos, a 0,1 mg de digitalina. A relação de potência entre o preparado em questão e o nosso padrão secundário de digitoxina foi de 1,40 quando aquela Farmacopéia (U.S.P. XV, 1955, pág. 220) recomenda para essa relação os limites de 0,90 a 1,10.

Entre os preparados à base de mistura de glicosídeos encontramos um produto de acordo com o rótulo na sua forma em comprimidos, mas com atividade menos da metade do rotulado na forma líquida, para uso oral. Outro preparado comercial, em ampolas injetáveis, apresentava maior teor do que o rotulado. Aqui a relação média de potência encontrada em 3 ensaios foi de 1,42.

A análise fiscal de 14 amostras de preparados comerciais à base de pó de folhas de digital, todos eles sob a forma de comprimidos, mostrou, em 9 preparados (64%), discordância para menos, entre a atividade rotulada e a atividade encontrada.

Na tabela II, exemplificamos um ensaio biológico procedido em produto comercial possuindo a atividade rotulada. Damos, no exemplo citado, a título ilustrativo, os cálculos recomendados pela U.S.P. XV (1955, pág. 877). O valor encontrado para L, menor do que 0,30, significa ter sido o ensaio satisfatório.

TABELA II

ENSAIO BIOLÓGICO, EM POMBOS, DE AMOSTRA DE PREPARADO DIGITALICO A BASE DE PÓ DE FÓLHAS (D3/57) EMPREGANDO-SE COMO REFERENCIA O PÓ PADRÃO (U.S.P., 1942)

NÚMERO DE INJEÇÕES LETAIS			
D3/57 (U = Desconhecido)		U.S.P. 1942 (S = Padrão)	
U	U ²	S	S ²
12	144	13	169
13	169	11	121
15	225	14	196
13	169	13	169
8	81	12	144
11	121	15	225
$\bar{v}_u = 12,2$	$f_u = 6$	$\bar{v}_s = 13,0$	$f_s = 6$

Soluções ensaiadas: U = 4 ml do extrato a 10% de D3/57 em 44 ml de salina heparinizada. 1 ml = 0,09 u.i. (valor rotulado)

S = 3 ml do extrato a 10% do Padrão em 33 ml de salina heparinizada. 1 ml = 0,09 u.i. (valor real)

R = Relação de diluição = 1

Potência $P = R \times \frac{\bar{V}_s}{\bar{v}_u} = 1 \times 13/12,2 = 1,06$

Variância $S_2 = 3,08$ $t^2 = 4,965 (0,05)$

C = 1,02 L = 0,29

Potência e limites fiduciais: $XP = 1,02 \times 1,06 \pm 1/2 \cdot 0,29$

P = 1,08 ± 0,15

(A Potência da solução desconhecida em relação ao padrão, está compreendida 19 vezes em 20, entre 0,93 e 1,23).

DISCUSSÃO

A atividade biológica e, como conseqüência, a potência terapêutica do pó de fôlhas de dedaleira dependem de vários fatores tais como a procedência, a época de colheita e de preparo, o tempo e as condições de conservação do produto. Daí a necessidade de padronizá-los, isto é, de aferir a sua atividade antes do emprêgo medicamentoso. Na prática, não há necessidade de standardizar biologicamente os glicosidos puros, cristalinos, obtidos da *Digitalis purpurea* ou da *Digitalis lanata*. A posologia nesses casos ater-se-á ao sistema métrico. Para a mistura de glicosidos brutos ou para aquêles preparados à base de pó de fôlhas, entretanto, recomenda-se o método de aferição biológica e, nessas condições, a posologia obedece ao sistema de "unidades" adotado por convenção internacional.

Não cabe discutir aqui o paralelismo entre as atividades biológica e terapêutica; se à maior cardiotoxicidade para o pombo, por via venosa, corresponde maior atividade por via oral no homem. WASICKY (1946) expôs as razões porque os ensaios biológico e químico da *Digitalis purpurea* não traduzem com segurança, a potência terapêutica da droga. Dadas, porém, as condições de emprêgo das preparações digitálicas no homem, a variação na sua resposta ao tratamento instituído e o tipo de preparado receitado, faltam ainda experiências comparativas, no homem e no animal, melhor analisadas estatisticamente, que permitam dirimir a questão. Para efeitos de fiscalização de preparados digitálicos, há, sem dúvida, maiores facilidades em se seguir o método baseado na cardiotoxicidade para o pombo do que, por exemplo, o sugerido por GOLD e col. (1942), baseado nas modificações electrocardiográficas do doente cardíaco. Parece ponto pacífico que, enquanto se empregar na prática médica as preparações galênicas da dedaleira ou a mistura de glicosidos brutos, não há como fugir da standardização biológica [SOMERS (1952) e ALLMARK & BACHINSKI (1946)].

Na escolha do método biológico, as condições locais devem ser levadas em conta. As nossas rãs são resistentes aos digitálicos CORBETT (1943), o gato relativamente difícil de se obter em número e condições apropriadas. Restam como animais de provas o pombo e o cobaio; êste preconizado na última revisão da Farmacopéia inglesa (1958) e aquêle na U.S.P. XV (1955). A Tabela I dá idéia da reprodutibilidade do método baseado no emprêgo do pombo. A cardiotoxicidade aumenta do pó de fôlhas para os extratos iniciais tipo *Digitalinum* e *Digaleno* e dêstes para a digitoxina. A

diferença entre as médias da dose letal (mg/kg de pombo) em 4 ensaios não atingiu 16% com o pó e 17% com a digitoxina padrões.

Este trabalho veio mostrar a necessidade de se estabelecer, entre nós, o mais breve possível, oficialmente, o padrão secundário de pó de fôlhas de digital aferido pelo padrão internacional. Já temos em estoque mistura de pós de fôlhas de *Digitalis purpurea* procedente dos Estados de São Paulo e de Santa Catarina, devidamente padronizada (MELLO & VALLE) e que poderá ser utilizada como padrão secundário pelo Instituto Adolfo Lutz. Tal providência vem sanar os inconvenientes registrados por ocasião de contraprovas fiscais de produtos analisados neste Setor.

RESUMO

O método de ensaio biológico de preparações digitálicas recomendado nas Farmacopéias internacional e norte-americana e baseado na cardiotoxicidade, por via venosa, para o pombo, foi seguido neste Setor com as modificações e os resultados aqui descritos.

Foram ensaiados os padrões de pó de fôlhas de dedaleira e de digitoxina distribuídos pela Comissão de Farmacopéia norte-americana, duas preparações: *Digitalinum* B. D. H. e digitoxina Merck tomadas como padrões secundários e uma preparação de Digaleno em substância. Não se observou diferença significativa na cardiotoxicidade da digitoxina padrão e da digitoxina Merck. O *Digitalinum* se mostrou, em média, 19,5 vezes mais ativo do que o pó padrão e o Digaleno, em média, 2,5 vezes mais ativo do que o *Digitalinum*.

Foram analisadas 38 amostras de preparados digitálicos, comerciais, apreendidos em São Paulo pelo Serviço de Fiscalização do Exercício Profissional e encontradas 10 amostras em desacôrdo para menos, até de 50%, e 2 para mais, até de 30%, da atividade mencionada na bula do preparado.

Foi apontada a necessidade de se estabelecer, entre nós, o mais breve possível, oficialmente, o padrão secundário de pó de fôlhas de digital aferido pelo padrão internacional.

SUMMARY

BIOLOGICAL ASSAY OF DIGITALIS PREPARATIONS

Standard and commercial preparations of *Digitalis* were biologically assayed in pigeons according to the U.S.P. XV method. Pentobarbital was used instead of ether anesthesia.

Either the reference standard or the unknown were diluted in such a way that the pigeons would be killed around the 14 th. injection in the alar vein.

Thirty eight samples of commercial products collected from local drugstores by State authorities were examined; ten of these were found to be less and 2 to be more potent than the labelled concentration.

AGRADECIMENTO

Agradecemos a colaboração prestada, durante a realização deste trabalho, pelos assistentes-bolsistas, farmacêutica Neide Hyppólito e dr. Antônio Cesário de Mello e pelos técnicos, Srs. Benedito Vieira Dias e Francisco Luís Ribeiro, auxiliados, em 1958, pelo Conselho Nacional de Pesquisas ou pela "Capes".

BIBLIOGRAFIA

- ALIMARK, M. G. & W. M. BACHINSKI — 1946 — A comparison of assay results by biological and chemical methods on *Digitalis purpurea* and digitalin (crystalline). *Rev. canad. Biol.*, 5: 570-586.
- British Pharmacopoeia — 1953 — 8.^a ed. General Medical Council, London.
- British Pharmacopoeia — 1958 — 9.^a ed. General Medical Council, London.
- CORBETT, C. E. — 1943 — Sobre o método da rã na padronização da digitalis. *Arch. bras. Med.*, 33: 29-31.
- FISHER, H. H. & C. A. SUTOL — 1950 — A note on the use of pigeons for the assay of digitalis products. *Jour. Amer. pharm. Ass., sci. Ed.*, 39: 422.
- GOLD, H., MCKEEN CATELL, H. L. OTTO, N. T. KWIT & M. L. KRAMER — 1942 — A method for the bio-assay of digitalis in humans. *J. Pharmacol.*, 75: 196-202.
- HOLCK, H. G. O. — 1951 — Laboratory Guide in Pharmacology. Burgess Publ. Co., Minneapolis, págs. 102-103.
- MELLO, A. C. & J. R. VALLE — Atividade biológica de amostras de dedaleira dos Estados de São Paulo e de Santa Catarina. *Rev. bras. Biol.*, (em impressão).
- Pharmacopoeia of the United States of America, The — 1950 — 14.^a Rev. Mack Print Co., Easton, Pa.
- Pharmacopoeia of the United States of America, The — 1955 — 15.^a Rev. Mack Print Co., Easton, Pa.
- Pharmacopoea internationalis — 1951 — World Health Organisation, Geneva.
- SOMERS, G. F. — 1952 — Recent advances in biological standardisation with particular reference to the assays of digitalis and posterior lobe pituitary extracts. *J. Pharm., Lond.*, 4: 793-802.
- WASICKY, R. — 1946 — A avaliação biológica da *Digitalis purpurea*. *An. Fac. Farm. Odont. S. Paulo*, 5: 25-38.