

Emergência da Bioquímica Interacção das culturas química e biológica

The Emergence of Biochemistry Interaction between chemical and biological cultures

Elisa Maria Campos¹

¹ Departamento de Bioquímica - Faculdade de Ciências Médicas Universidade Nova de Lisboa , Campo Mártires da Pátria, 130 , 1169-056 Lisboa PORTUGAL

Resumo

Em primeiro lugar, definiremos o âmbito da disciplina de bioquímica. Veremos assim como, à medida que a química orgânica

se tornava na química dos compostos de carbono, houve necessidade de criar um novo ramo de química que se dedicasse, quer

ao estudo dos constituintes e processos do organismo a química fisiológica, quer à interacção de diferentes áreas de investigação (química orgânica, fisiologia e biologia). Foi desta convergência que a bioquímica emergiu, nos finais do século XIX. Seguiremos depois o desenvolvimento das ideias e conceitos de fotossíntese, oxidação, respiração e fermentação, cujo esclarecimento forneceu a base química da função celular; e, ainda, como o estudo destes fenómenos da vida foi retardado, quer pela oposição dos químicos à participação de uma entidade biológica a levedura na química da fermentação, quer pelo esquecimento a que Pasteur votou a química, apesar de ter identificado a função da levedura, perdendo a descoberta das enzimas, força vital da fermentação e ponte de ligação entre a química e a biologia. Foi esta interacção entre as culturas química e biológica que permitiu demonstrar a unidade da natureza em todos os aspectos do crescimento celular e funções das plantas, animais e microorganismos.

O nosso objectivo é mostrar os esforços desenvolvidos na explicação dos fenómenos biológicos nos organismos vivos e a permeabilidade da biologia, da medicina e da agricultura a conceitos e métodos químicos. No decorrer destes esforços, houve uma complexa e contínua interacção entre química e biologia, na qual se envolveram muitos cientistas de diferente formação.

Palavras-Chave: bioquímica; oxidação; fermentação; fotossíntese; história.

Abstract

First, we will define the subject matter of biochemistry. We will describe how, as organic chemistry became the chemistry of carbon compounds, there was a need for a new branch of chemistry aimed at the description of substances and processes of the living organism physiological chemistry; and how biochemistry emerged from the interactions of different research areas (organic chemistry, physiology and biology) at the end of the 19th century. Then, we will follow with consequent attempts to explain the behaviour of cells in chemical terms in photosynthesis, oxidation, respiration and fermentation; and how the chemistry of life was delayed, in part because chemists were contemptuous of attributing the chemistry of fermentation to yeast cells and in part because Pasteur, who did appreciate the role of yeast, neglected his chemical roots missing the discovery of enzymes vital force of fermentation and a bridge between chemistry and biology. Only through the interaction between the cultures of chemistry and biology was it possible to show the unity of nature in all aspects of cellular growth and the function of plants, animals and microorganisms.

Our subject is the historical development of efforts to explain biological phenomena in terms of the specific properties of chemical substances present in living organisms, with chemical concepts and methods permeating the advancement of biology, medicine and agriculture. In this effort there has been a complex interplay of chemistry and biology in which scientists of various backgrounds took part.

Key-Words: biochemistry; oxidation; fermentation; photosynthesis; history.

Recebido em 11/11/2005

Aceite em 18/04/2006

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2006; (3) 1: 19-36

Versão electrónica: <http://revistasaude.ulusofona.pt>

Âmbito da Bioquímica

A Bioquímica clássica é a disciplina que estuda, essencialmente, as enzimas e vias metabólicas por elas catalisadas. No entanto, o estudo de como estas reacções foram estabelecidas experimentalmente raramente é descrito. O conhecimento das limitações dos procedimentos disponíveis na época em que as reacções foram descritas, bem como dos contextos conceptuais nos quais os novos resultados tinham de ser reajustados, pode ajudar os bioquímicos a compreenderem como a sua disciplina começou e as mudanças radicais que tiveram lugar durante a segunda metade do século XIX e publicou, nesse mesmo ano, um manual, *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, no qual organizou o conhecimento existente sobre as substâncias químicas que compunham o organismo animal do século XIX.

Em 1843, Carl Gotthelf Lehmann (1812-1863), fisiologista alemão, foi nomeado Professor *ausserordentlicher* de química fisiológica na Universidade de Leipzig e as contínuas transformações que sofriam. Em 1853, foi publicada uma 2ª edição, alargada, o que reflectia o interesse que este tema suscitava. No entanto, quando Lehmann deixou Leipzig, em 1856, a disciplina desapareceu, um sinal de prematuridade da ideia de estabelecer esta disciplina como uma nova especialidade^[1]. Em 1877, Felix Hoppe-Seyler (1825-1895), na introdução ao 1º volume de *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, considerou a “bioquímica” como uma disciplina independente^[2], mantendo, no entanto, a designação de Química Fisiológica na revista. É de salientar que esta dedicada à publicação de artigos centrados na aplicação da química orgânica aos processos biológicos foi única na área da química fisiológica durante trinta anos. Segundo Teich, Hoppe-Seyler referia-se à química fisiológica como “bioquímica” por considerar que, a partir de 1840, os conhecimentos científicos da química da vida transcendiam os aspectos químicos dos fenómenos fisiológicos, sendo aplicados a problemas do âmbito da medicina, agronomia e indústria. Além disso, os investigadores desta área adquiriam a consciência de que estas pesquisas constituíam uma especialidade individualizada dos estudos fisiológicos, com métodos e conceitos próprios. Foi este reconhecimento que conduziu à separação da química fisiológica da fisiologia e, de facto, à sua transformação em “bioquímica”^[3]. Também Fruton considera que a matriz teórica da bioquímica ganhou uma especificidade própria para o estudo das reacções químicas nos organismos vivos, conduzindo assim ao aparecimento de uma linguagem, métodos e instrumentos específicos^[4]. Hoppe-Seyler terá sido o criador da Bioquímica, entendendo-a como ramo do conhecimento autónomo e ensinando-a na Universidade de Tübingen onde fundou um Instituto independente em 1861^[5]. Em 1872, Hoppe-Seyler

Biochemistry Scope

Classic Biochemistry is the subject that studies, principally, the enzymes and their catalysed metabolic pathways. However, the study of how these reactions were established experimentally is rarely described. The knowledge of the limited available procedures at the time in which the reactions were described and the theoretical contexts in which the new results had to be readjusted, can help the biochemists to understand how their subject started and the radical changes that have taken place during the second half of the 19th century. In 1843, Carl Gotthelf Lehmann (1812-1863), a German physiologist, was appointed Professor *ausserordentlicher* of Physiological Chemistry at the University of Leipzig. He published in that same year, the manual “*Lehrbuch der Physiologischen Chemie*”, in which he organised the existing knowledge on chemical substances that constitute the animal organism and their continuous transformations. In 1853, an extended second edition was published, which was a reflection of the interest that had risen on the subject. However, when Lehmann left Leipzig in 1856, the subject matter disappeared, an indication of the idea being too premature to establish this subject as a new area of expertise^[1]. In 1877, Felix Hoppe-Seyler (1825-1895), considered in his introduction to the 1st volume of “*Zeitschrift für Physiologische Chemie*”, “biochemistry” as an independent subject^[2], although he kept the designation Physiological Chemistry in the journal. It should be pointed out that this journal committed to publish articles centred on organic chemistry's application to biologic processes was the only one in the physiological chemistry field for 30 years. According to Teich, Hoppe-Seyler refers to the physiological chemistry as “biochemistry” because the scientific knowledge of the chemistry of life from the 1840's on surpassed the chemical aspects of the physiological events; this knowledge was applied to problems related to medicine, agronomy and industry; the researchers in this area acquired the knowledge that this research constituted an individualised speciality of physiological studies, with its own methods and concepts. It was this acceptance that led to the separation of physiological chemistry from physiology and in fact to the transformation into “biochemistry”^[3]. Fruton also considered that the theoretical matrix of biochemistry gained its own specificity in the study of chemical reactions in living organisms, leading therefore to a specific language, methods and instruments^[4]. Hoppe-Seyler may be considered the creator of Biochemistry, understanding it as a part of autonomous knowledge and teaching it at the University of Tübingen where he founded an independent Institute in 1861^[5]. In 1872, Hoppe-Seyler moved to Strasburg, where a new subject was being created. This way Tübingen and Strasburg were the only two German universities to have physiological chemistry as a subject. In other cities the subject was

mudou-se para Estrasburgo, iniciando o ensino e a prática desta disciplina na Universidade local. Assim, Estrasburgo e Tübingen, tinham as duas únicas Universidades alemãs onde o ensino da Química Fisiológica era ministrado. Nas outras cidades, o tema era dividido pela química orgânica e a fisiologia. Faltava, no entanto, entender a base química da função celular, sem o recurso ao vitalismo. Esse entendimento só foi possível pela interação entre as culturas química e biológica; esta interação veio permitir a compreensão dos fenómenos da química da vida em termos físico-químicos. Assim, para a teoria celular ser aceite e haver uma interpretação correcta da fermentação causada por microorganismos os trabalhos de Louis Pasteur (1822-1895) foram da maior importância^[6-8]. No entanto, Pasteur continuou a ser um vitalista. Foram ainda determinantes, entre 1872 e 1875, os trabalhos de Eduard Wilhelm Pflüger (1829-1910), que esclareceu a respiração celular^[9-10] e, finalmente, a observação decisiva para a constituição da bioquímica clássica, descrita por Eduard Buchner (1860-1917), de que a fermentação ocorria num extracto de levedura livre de células^[11] portanto, na ausência de células organizadas. Robert Kohler salienta o paralelo existente entre a emergência do conceito de enzima e a auto-consciência da especialidade “bioquímica”. A nova explicação dos fenómenos da vida — metabolismo, respiração, fermentação — constituiu a base conceptual para o reconhecimento da disciplina como separada e independente, quer da química, quer da fisiologia^[12]. Podemos considerar a bioquímica como uma nova disciplina proveniente de outras áreas afins, nascida de um processo de intersecção, mas com um corpo teórico e metodológico de análise distintos daqueles das áreas a partir das quais se formou, ou seja, uma ciência ponte^[13]. A bioquímica moderna envolve também a utilização dos conhecimentos adquiridos através da investigação clássica. Isto é concretizado pela aplicação a outras ciências - medicina, medicina veterinária, agronomia, farmacologia, ou a solucionar problemas tecnológicos bioquímica aplicada, engenharia bioquímica. Assim, num conceito moderno, a Bioquímica, a nível molecular, excede o âmbito da Biologia e, segundo Arthur Kornberg (n. 1918), prémio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1959, a unidade da Bioquímica na natureza, encontrada em todos os aspectos do crescimento celular e aspectos funcionais das plantas, animais e microorganismos, terá sido uma das revelações do século XX^[14].

Áreas de investigação Química Orgânica, Fisiologia e Biologia

Estas são três áreas aparentemente não interligadas, mas que conduziram à análise das células vivas. Uma primeira área, extremamente importante, foi a análise elementar quantitativa de produtos naturais. Em 1810, Joseph-Louis Gay-

divided between organic chemistry and physiology. However, the chemical basis of cellular function was not understood without the hypothesis of vitalism. This understanding was only feasible through the interaction between the cultures of chemistry and biology, which made possible the comprehension of the phenomena of life in chemical terms. In order for the cellular theory to be accepted and for a correct interpretation of fermentation (caused by microorganisms), we had to wait for Louis Pasteur's works (1822-1895)^[6-8]. However, Pasteur persisted on being a vitalist. Also important were the works of Eduard Wilhelm Pflüger (1829-1910) between 1872 and 1875, which explained cellular respiration^[9-10]. Finally, it was with Eduard Buchner's (1860-1917) observation that fermentation occurred in an extract of yeast free of cells^[11] (therefore in the absence of organized cells), that we come into classic biochemistry. Robert Kohler emphasises the existing parallel between the emergence of the enzyme concept and the self-conscience of “biochemistry” as a speciality. The new explanation of the phenomena of life — metabolism, respiration and fermentation, constituted the theoretical base for the recognition of the subject matter as separate and independent from both chemistry and physiology^[12]. We can consider biochemistry as a new subject matter deriving from other related areas, created by an intersection process but with a distinct theory body and methodical analysis of the areas from which it came, that is, a bridging science^[13]. Modern biochemistry also consists in using knowledge acquired through classic research, applying it to other sciences — medicine, veterinary medicine, agronomy and pharmacology — or by resolving technological problems — applied biochemistry and biochemical engineering. Therefore, in a modern concept, Biochemistry exceeds Biology at a molecular level and its unity in nature, found in all aspects of cellular growth and functional aspects of plants, animals and microorganisms, was one of the revelations of the 20th century, according to Arthur Kornberg (n. 1918), Nobel Prize in Medicine and Physiology in 1959^[14].

Research areas - Organic Chemistry, Physiology and Biology

These are the three areas, apparently not interlinked, that lead to the analysis of living cells. The first extremely important area was the elementary quantitative analysis of natural products. In 1810, Joseph-Louis Gay-Lussac (1778-1850) and Louis-Jacques Thénard (1777-1857) proved that several organic compounds contained only carbon, hydrogen and oxygen, with these last two present in proportions found in water. Compounds like sugar and starch were classified as carbohydrates, or saccharides. Various natural products were isolated; however it was only in 1831, that analyses were

Lussac (1778-1850) e Louis-Jacques Thénard (1777-1857) tinham mostrado que vários compostos orgânicos continham apenas carbono, hidrogênio e oxigênio, os dois últimos presentes nas proporções encontradas na água. Compostos como o açúcar e o amido foram classificados como hidratos de carbono, ou glúcidos. Vários produtos naturais foram isolados; no entanto, só em 1831 se obtiveram análises reprodutíveis dos teores de carbono, hidrogênio e oxigênio com os aperfeiçoamentos introduzidos por Justus von Liebig (1803-1873), pelo processo de combustão^[15]. A análise quantitativa teve um grande impacto no desenvolvimento da química orgânica estrutural e esta foi um dos pilares da bioquímica.

Jean-Baptiste Dumas (1800-1884) viu os fenômenos químicos nos animais na perspectiva de um químico orgânico. Compreendeu os processos de decomposição, que descreveu como meios de ligar os estados inicial e final das substâncias envolvidas. A sua última aula do curso da Escola de Medicina de Paris, em 1841, intitulada *Essai sur la statique chimique des êtres organisés* foi publicada em francês e inglês. Afirmava essencialmente a teoria da respiração já formulada há 50 anos por Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) e Pierre-Simon Laplace (1749-1827): “sendo o fenômeno mais complexo do que aqueles autores tinham pensado”. Segundo aqueles autores, a respiração era uma combustão lenta, directa, de carbono e hidrogênio, ocorrendo provavelmente nos pulmões, ponto de contacto entre estes elementos circulando no sangue e o oxigênio do ar. De acordo com Dumas, contudo, a combustão dos materiais orgânicos não tem lugar de uma só vez; porque destruindo-os, os animais “alteram-nos por etapas ... aos tecidos e vasos, chegam novos materiais orgânicos, mas estes são sempre mais simples, mais perto do estado elementar do que aquele em que os animais os receberam. Portanto, as matérias orgânicas criadas pelas plantas decompõem-se por etapas ao estado de ácido carbônico, água e amônia, um estado que lhes permite serem restituídas à natureza”^[16]. As ideias de Dumas sobre a combustão dos elementos derivam da sua percepção geral das composições elementares e propriedades químicas das três categorias básicas de substâncias: hidratos de carbono ou glúcidos, gorduras e “corpos albuminóides” nitrogenados conhecidos como componentes de plantas e animais desde a década anterior. Foi Dumas quem, em 1830, introduziu a determinação quantitativa do azoto. O carácter quase idêntico destas três categorias de compostos em plantas e animais induziu Dumas a pensar que as plantas criavam todas as substâncias necessárias aos animais e que estes não tinham necessidade de criar nenhuma. Os químicos tinham aprendido que sob condições cuidadosamente controladas no laboratório, vários compostos

obtinham reproduzindo os conteúdos de carbono, hidrogênio e oxigênio devido a melhoramentos introduzidos por Justus von Liebig (1803-1873), através do processo de combustão^[15]. A análise quantitativa teve um grande impacto no desenvolvimento da química orgânica estrutural, que se tornou uma das bases da bioquímica.

Jean-Baptiste Dumas (1800-1884) viu os eventos químicos nos animais com a percepção de um químico orgânico. Ele compreendeu os processos de decomposição, que ele descreveu como meios de ligar as etapas inicial e final das substâncias envolvidas. Sua última aula no curso da Escola de Medicina de Paris, em 1841, intitulada *Essai sur la statique chimique des êtres organisés* foi publicada em francês e inglês. Ele essencialmente afirmou a teoria da respiração já formulada 50 anos antes por Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) e Pierre-Simon Laplace (1749-1827): “sendo um evento mais complexo do que o que os autores tinham considerado”. De acordo com aqueles autores, a respiração era uma combustão directa, lenta, de carbono e hidrogênio, ocorrendo provavelmente nos pulmões, ponto de contacto entre estes elementos circulando no sangue e o oxigênio do ar. De acordo com Dumas, no entanto, a combustão de substâncias orgânicas não acontecia de uma só vez; porque enquanto as destruía, os animais “transformam-nas em etapas... novas substâncias orgânicas chegam aos tecidos e vasos, mas estas são sempre mais simples, mais próximas do estado elementar do que quando recebidas pelos animais. Portanto as substâncias orgânicas criadas pelas plantas decompõem-se em etapas até ao estado de ácido carbónico, água e amoníaco, um estado que lhes permite serem restituídas à natureza”^[16]. A percepção de Dumas dos elementos de combustão origina-se na sua compreensão geral das composições e propriedades químicas das três categorias básicas de substâncias: carboidratos ou sacarídeos, gorduras e nitrogenadas “albuminosas” conhecidas como componentes de plantas e animais desde a década anterior. Em 1830, Dumas introduziu a análise quantitativa do nitrogénio em compostos orgânicos. Foi a semelhança característica entre as três categorias em plantas e animais que levou Dumas a pensar que as plantas criavam todas as substâncias necessárias aos animais e que estes não tinham necessidade de criar nenhuma. Os químicos tinham aprendido que sob condições cuidadosamente controladas no laboratório, vários compostos

obtinham reproduzindo os conteúdos de carbono, hidrogênio e oxigênio devido a melhoramentos introduzidos por Justus von Liebig (1803-1873), através do processo de combustão^[15]. A análise quantitativa teve um grande impacto no desenvolvimento da química orgânica estrutural, que se tornou uma das bases da bioquímica.

orgânicos sofriam oxidações parciais e combustão incompleta, daí resultando uma série de compostos mais simples contendo proporções mais elevadas de oxigênio, formando-se anidrido carbônico e água como produtos finais de sucessivas “metamorfoses”. Dumas pressupôs estas mesmas reações ocorrendo no organismo e assim, concluiu que os animais convertem os alimentos ao longo de várias etapas, e não de uma só vez, até aos produtos finais que excretam.

Uma das razões que levaram Dumas e Lehmann, entre outros, a pensarem que podiam elucidar a oxidação gradual dos alimentos no organismo com os métodos correntes em química, foi a convicção de que estes processos se davam na circulação sanguínea. O sangue era um fluido cujos constituintes se separavam por meios químicos e cujas propriedades físicas podiam ser especificadas. As reações orgânicas ocorriam tipicamente também em meio fluido, levando-os a considerarem que as reações no sangue se inseriam nos fenômenos químicos que lhes eram familiares^[17].

Como Dumas, Liebig tinha inferido da teoria da respiração de Lavoisier, juntamente com o seu próprio conhecimento da composição e propriedades das matérias das plantas e animais, da natureza dos processos químicos que ocorrem nos animais. Liebig acreditava que a combustão de gordura e glúcidos (respiração) ocorria no sangue e pensava que as proteínas eram os únicos nutrientes assimilados pelos animais. Entre as asserções de Liebig havia a de que produzindo trabalho, os músculos consomem as suas próprias substâncias nitrogenadas, podendo esta decomposição ser medida através da determinação da ureia na urina^[18]. A ureia permitiria diferenciar o metabolismo na doença.

Uma segunda área importante na investigação da química dos fenômenos da vida foi a fisiologia.

Em 1848, Claude Bernard (1813-1878) aparecia em Paris como um fisiologista experimental de grande talento; era assistente de François Magendie (1783-1855) e publicava um artigo “Sobre a origem do açúcar na economia animal”. Com um teste simples para detectar a presença de açúcar, criado por Charles-Louis Barreswil (1817-1870), Bernard tinha verificado a presença de açúcar no sangue de cães, quer estes tivessem sido alimentados com açúcar, amido ou carne, quer tivessem jejuado por dois dias. Estes resultados provavam estar errado o pressuposto de que o açúcar no sangue provinha da digestão do açúcar ou do amido e levaram Bernard a procurar a origem do açúcar no animal. Posteriormente, em cães alimentados sem açúcar, concluiu que o açúcar provinha do fígado. Confirmou este resultado extraindo açúcar do fígado. “Em face destes resultados... os animais, como as plantas, criam e decompõem açúcar”^[19]. Em

gradual oxidation of food in the organism with the existing methods of chemistry, was the conviction that all these processes occurred in blood circulation. Blood was a fluid which constituents would separate by chemical means and which physical properties could be specified. The organic reactions would also typically occur in a fluid atmosphere, leading them to consider that the reactions in the blood were part of the chemical events they were familiar with^[17].

As Dumas, Liebig had concluded from the respiration theory of Lavoisier and in conjunction with his own knowledge of the composition and properties of plant and animal substances, the nature of the chemical processes that occur in animals. Liebig believed that the combustion of fats and saccharides (respiration) occurred in the blood and thought that proteins were the only nutrients assimilated by the animals. Among Liebig's assertion was that in producing work, the muscles consume their own nitrogenous substances and their decomposition could be measured by the quantity of urea in urine^[18]. Determination of urea could then provide a measure of the metabolism in health and disease.

The second important area in the study of living cells was physiology. In 1848, Claude Bernard (1813-1878) appeared in Paris as an experimental physiologist of great talent. He was the assistant of François Magendie (1783-1855) and had published an article “About the origins of sugar in the animal economy”. With a simple test to detect the presence of sugar, created by Charles-Louis Barreswil (1817-1870), Bernard verified the presence of sugar in dogs' blood, whether they were fed sugar, starch, and meat or fasted for two days. These results proved that the presumption about sugar in the blood coming from sugar or starch digestion was wrong and led Bernard to search for the origins of sugar in the animal. Subsequently in dogs fed with no sugar, he concluded that sugar came from the liver. He confirmed these results by extracting the sugar from the liver. “As per these results... both animals and plants, created and decomposed sugar”^[19]. In 1857, he described the isolation of glycogen from liver. For its similarities with plant starch it was also designated “animal starch”. This discovery brought a new perspective to the chemistry of life, making a contribution in breaking the barrier that was supposed to exist between the animal and plant worlds. Claude Bernard was a sceptic regarding the possibility of chemistry predicting reactions that would occur in animals, but thought that by combining chemical detection tests and vivisection it would be possible to identify the chemical transformations through the blood circulation^[20]. Physiologists could interpret their observations in chemical terms.

In 1845, Hermann von Helmholtz (1821-1894), an experimental physiologist, showed that the activity of one isolated muscle produced a change in the

1857, descreveu o isolamento do glicogénio do fígado. Pela sua semelhança com o amido do mundo das plantas também foi designado por “amido animal”. Esta descoberta trouxe uma nova perspectiva à química da vida, contribuindo para romper a barreira que se supunha existir entre o mundo animal e o mundo das plantas. Claude Bernard era céptico quanto à possibilidade da química prever reacções que ocorressem nos animais, mas pensou que por combinação de testes de identificação química e vivisseccão se poderiam identificar as transformações químicas através da circulação sanguínea^[20]. Tornava-se possível para os fisiologistas interpretar as suas observações em termos químicos. Em 1845, Hermann von Helmholtz (1821-1894), fisiologista experimental, mostrou que a actividade de um músculo isolado produz uma alteração da composição química no tecido. Helmholtz removeu dois músculos idênticos de uma rã, estimulou um deles por uma série de descargas eléctricas, contraindo-o repetidamente até estar exausto e procurou alterações quantitativas em algum dos poucos constituintes químicos identificáveis do tecido do músculo pelos métodos do tempo. Não conseguiu detectar uma alteração nas quantidades relativas de nenhuma substância específica tentou albumina, gorduras e fibra muscular - mas mostrou de forma convincente que a proporção de substâncias solúveis em água decrescia no músculo electrificado, enquanto a proporção solúvel em álcool aumentava^[21]. Claude Bernard e Helmholtz utilizavam uma combinação de métodos fisiológicos e químicos para estudar os fenómenos da vida, mas os seus estudos experimentais eram diferentes^[22]. As condições fisiológicas das experiências de Helmholtz eram simples. Bissectou músculos de rã e estimulou um deles a contrair-se como uma peça de tecido isolada. Obteve resultados quantitativos precisos com os métodos limitados de extracção química do seu tempo. Bernard apenas obtinha indicações semi-quantitativas, como “não há vestígios”, “presença positiva”, “grande quantidade” ou “enorme quantidade”. O seu talento manifestava-se nas experiências de vivisseccão e no modo como colhia as amostras de sangue, em localizações estratégicas da circulação dos animais em condições fisiológicas específicas.

Em comum, Bernard e Helmholtz, partilhavam a perspectiva de que tinham que investigar directamente o que outros, como Dumas e Liebig, tentavam inferir indirectamente dos alimentos, dos produtos finais e das propriedades químicas das substâncias orgânicas. Helmholtz isolava parte do animal onde a alteração química que ele procurava ia ocorrer, enquanto Bernard identificava alterações químicas no animal como um todo, para ver onde ocorriam. Helmholtz terá aprendido os métodos utilizados em química animal, com Eilhard Mitscherlich (1794-1863), estudante de Berzelius.

chemical composition in the tissue. Helmholtz removed two identical muscles from a frog, stimulated one of them by a series of electric discharges, contracting it repeatedly until exhausted and he then searched the quantitative changes in one of the few chemical components identified in the muscle tissues by the methods present at the time. He was not able to detect an alteration in quantities related to any specific substance - he tried albumin, fats and muscular fibres but he showed convincingly that the proportion of soluble substances in the water decreased in the electrified muscle while the soluble proportion in alcohol increased^[21]. Claude Bernard and Helmholtz used a combination of physiological and chemical methods to study the phenomena of life, but their experimental research was different^[22]. The physiological conditions of Helmholtz's experiments were simple. He bisected the frog's muscles and stimulated one part to contract itself as an isolated part of tissue and obtained precise quantitative results with the limited methods of chemical extraction at that time. Bernard only obtained half-quantitative indications such as “no trace”, “positive existence”, “high quantity” or “great quantity”. His talent was shown in his vivisection experiments and how he collected blood samples, in strategic locations of the animal's circulation in specific physiological conditions.

Bernard and Helmholtz shared the belief that they had to investigate directly what others, like Dumas and Liebig, tried to deduce indirectly from the food, final products and chemical properties of the organic substances. Helmholtz isolated the animal part where the chemical change he sought would happen, whilst Bernard identified chemical changes in the animal as a whole to see where they would occur. Helmholtz would have learned the methods used in animal chemistry, with Eilhard Mitscherlich (1794-1863), student of Berzelius. In addition he had worked with Gustav Magnus (1802-1870), a German physicist who had also studied with Berzelius^[23]. The way Helmholtz approached the complex problem of chemical change in muscle action in order to obtain a simple quantitative measurement may reflect the influence of that physicist. Bernard neither had great knowledge of chemistry nor of its methods; frequently he trusted his chemist friends Barreswil and Théophile-Jules Pelouze (1807-1867) to teach him the methods that he needed^[24]. The results obtained allowed him to directly challenge Dumas's idea expressed in his class on static chemistry of the living organisms, that animals only decompose the substances received from plants.

Each of these researchers had great influence on their contemporaries. The different approaches of research taken reflected their educations and their use of different methodological principles.

With the improvement of the microscope at the beginning of the 19th century, we enter the third area that leads to living cell analysis: Biology. In 1824,

Para além disso, tinha trabalhado com Gustav Magnus (1802-1870), físico alemão, que também tinha estudado com Berzelius^[23]. O modo como Helmholtz abordou o problema complexo da alteração química na acção do músculo, de modo a obter uma medida simples quantitativa, pode reflectir a influência daquele físico. Bernard não tinha grande conhecimento dos fenómenos químicos, nem dos seus métodos; com frequência confiava na ajuda dos seus amigos químicos Barreswil e Théophile-Jules Pelouze (1807-1867), para lhe ensinarem os métodos de que necessitava^[24]. Os resultados obtidos permitiram-lhe desafiar, directamente, a percepção expressa por Dumas na sua aula sobre a química estática dos organismos vivos, de que os animais só decompõem as substâncias que recebem das plantas. Cada um destes investigadores exerceu grande influência nos contemporâneos. As diferentes abordagens de investigação que seguiram eram reflexo das suas educações e dos diferentes fundamentos metodológicos que utilizavam.

Com o aperfeiçoamento do microscópio no início do século XIX, entramos na terceira área que conduziu à análise das células vivas: a biologia. Em 1824, o médico René-Joachim Henri Dutrochet (1776-1847) tinha proposto que todos os tecidos orgânicos são células globulares extremamente pequenas, que parecem estar unidas apenas por forças adesivas simples. Os meios de que dispunha não eram, no entanto, os mais adequados e as suas observações e conclusões, por vezes, não eram muito convincentes; os corpúsculos intracelulares confundiam-se. Segundo V. Kruta, a importância de Dutrochet provem do seu empenho em demonstrar que os fenómenos vitais podem ser explicados com base nas leis da física e da química, sem necessidade de supor a existência de uma “força vital”^[25]. A presença do núcleo como característica das células das plantas foi reconhecida em 1833, por Robert Brown (1773-1858), botânico escocês^[26]. Théodore Schwann (1810-1882), um fisiologista, aborda em 1838, o estudo das células, beneficiando dos primeiros microscópios acromáticos. Vai perceber o significado funcional do núcleo, quer nas células das plantas, quer nas células animais. Segundo ele, células são organismos; animais e plantas intactos são agregados destes, regidos por leis definidas^[27]. É Schwann quem cria a palavra “metabolismo” em 1839, no final das suas *Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants*, um tratado conhecido por ser a base da teoria das células. “As células não só atraem matérias de fora do citoblastema, mas devem ter a faculdade de produzirem alterações químicas nas suas partículas constituintes. Para além disso, todas as partes da célula podem ser alteradas quimicamente durante o processo vegetativo. Designaremos a causa de todos estes fenómenos metabólicos das células por

Doctor René-Joachim Henri Dutrochet (1776-1847) proposed that all organic tissues were extremely small globular cells that seemed to be united only by simple adhesive forces. However, the means at his disposition were not the most adequate and sometimes his observations and conclusions were not extremely convincing; the intracellular corpuscles were indistinguishable. According to V. Kruta, the importance of Dutrochet comes from his commitment in demonstrating that the vital event can be explained based on physics and chemistry laws, with no need to presume the existence of a “vital force”^[25]. The presence of a nucleus as a trait of plant cells was recognised in 1833 by the Scottish botanist Robert Brown (1773-1858)^[26]. The advances in cell research in 1838, made by the physiologist Theodore Schwann (1810-1882), benefited from the first achromatic microscope. He understood the functional significance of the nucleus in both plants and animals. According to Schwann, cells are organisms; intact animals and plants are aggregations of these, ruled by defined laws^[27]. It was Schwann that created the word “metabolism” in 1839, in the final part of his *Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants*, a treaty known for being the basis of cell theory. “The cells not only attract matter out of the cytoblastema but have the ability to produce chemical alterations in its constituent particles. In addition, all the parts of the cell can be chemically changed during the vegetative process. The cause for all these cell metabolic events will be denominated metabolic power”^[28].

Without any direct knowledge of the chemical transformations produced by animal cells, Schwann mentioned fermentation as “the best known illustration of the operation of the cells and the simplest representation of the process that repeats itself in each cell of the living organism.” The fermentation in which sugar is converted into alcohol and CO₂ was already expressed in a defined chemical equation and for Schwann the process was associated to the growth of simple plant cells, a perspective that will cause controversy in the following twenty years, as we will see.

In 1838 Pierre-Jean-François Turpin (1775-1840), botanist and illustrator, publishes an article confirming the observations of Schwann and microscopist Charles Cagniard de Latour (1777-1859) performed on yeasts, in “*Annalen der Pharmacie*”, a journal edited by Liebig, Dumas and Thomas Graham (1805-1869). Liebig was strongly against the cell theory and the postulated function of yeast in fermentation; he published a satiric article straight after the one from Turpin, mocking the interpretations of the cell theorists^[29]. His great influence contributed to the delay in the adoption of Schwann's ideas about cell function. In his fermentation research, Schwann suggested in 1837 that putrefaction was due to “living germs” in the air;

poder metabólico^[26].

Sem conhecimento directo das transformações químicas produzidas pelas células animais, Schwann mencionou a fermentação como “a melhor ilustração conhecida da operação das células e a representação mais simples do processo que se repete em cada célula do organismo vivo”. A fermentação, na qual o açúcar é convertido em álcool e CO₂, já era expressa por uma equação química definida, e para Schwann o processo estava associado ao crescimento das células simples de plantas, uma perspectiva que se manteve controversa durante os vinte anos seguintes, como iremos ver.

Em 1838, Pierre-Jean-François Turpin (1775-1840), botânico e ilustrador, publica um artigo nos *Annalen der Pharmacie*, editado por Liebig, Dumas e Thomas Graham (1805-1869), onde confirma as observações em leveduras de Schwann e Charles Cagniard de Latour (1777-1859), outro médico microscopista. Liebig opunha-se fortemente à teoria da célula e à função postulada para a levedura na fermentação e publicou um artigo satírico logo a seguir ao de Turpin, caricaturando as interpretações dos teóricos da célula^[29]. A sua grande influência contribuiu para o atraso na adopção das ideias de Schwann sobre a função das células. Nos seus estudos de fermentação, Schwann tinha sugerido em 1837, que a putrefacção era devida a “germes vivos” no ar; mostrou que se uma suspensão de levedura fosse aquecida e ar aquecido passasse por ela, não haveria fermentação; reconheceu a natureza viva das leveduras e ligou fermentação a multiplicação do organismo. Schwann era também um vigoroso anti-vitalista, não aceitando a ideia de uma força cujas propriedades se alterassem com o órgão a estudar, exibindo contractilidade no músculo ou excitabilidade nos nervos^[27]. No seu estudo de células, usou principalmente observações microscópicas e caracterizou as células pelas estruturas visíveis e não pelas propriedades químicas. Não tinha por objectivo definir processos “metabólicos” associados à actividade celular; para além da comparação com fermentação, não deu indicações de como seriam estudados os fenómenos químicos à escala microscópica das células que descreveu. Schwann acabou por ir para Lovaina como professor de Anatomia e pouco mais investigou sobre a célula.

Foi preciso esperar-se pela década de 80 para os químico-fisiologistas apreenderem os fundamentos que Schwann lançara em 1839 e verem a célula como a unidade fundamental básica do organismo, locus dos processos vitais. Hoppe-Seyler no seu livro *Physiologischen Chemie*, de 1881, resumia sucintamente as consequências desta perspectiva para o estudo dos fenómenos da vida: estes fenómenos eram transferidos do sangue para as células. Correspondia, portanto, a uma reformulação do problema^[30].

he showed that if a yeast suspension was warmed up and the hot air would pass on top of it, there would not be fermentation; he recognized the living nature of the yeasts and linked fermentation to organism multiplication. Schwann was also a vigorous anti-vitalist, not accepting the idea of a force whose properties would alter with the studied organ, showing a contraction in the muscles or excitement in the nerves^[27]. He used in his cell research mainly microscopic observations and characterized the cells by their visible structures instead of their chemical properties. He did not aim to define “metabolic” processes associated to cell activities; apart from comparing them to fermentation, no indications were given in how the chemical events he described were being studied at a microscopic level. Schwann went on to be an anatomy professor in Lovaina and did not investigate much more about the cell.

It was not until the 1880's that the physical chemists learned the principles that Schwann presented in 1839 and considered the cell as a fundamental basic unit of the organism, locus of the vital processes. Hoppe-Seyler in his book *Physiologischen Chemie* of 1881, made a short summary of the consequences of this perspective for the study of the phenomena of life: these phenomena were transferred from the blood to the cells. It corresponded therefore to a reformulation of the problem^[30].

During the first half of the 19th century, chemists preoccupied with human, animal and plant chemistry were ambivalent to the existence of a vital force and effectively adopted a position of vitalist idealism. Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) was one of the few that clearly registered this in a report on animal chemistry presented at the Swedish Science Academy in 1810, of which the English translation was published in 1818. Berzelius was a vitalist idealist regarding life origins. But he was a materialist regarding animal and plant composition and processes that occurred in living organisms. An important example is his concept of “catalytic force”^[31]. The urea synthesis by Friedrich Wöhler (1800-1882), in 1828, revealed a contradictory fact about the chemical vitalism that helped to refute it. At the same time it forced the vitalists to think and adjust their approach on what science had learned about physical chemistry of life. This experience established a landmark in the history of biochemistry. The contradiction that arises could only be resolved by the development of its chemical and biological aspects. In fact chemistry, until then united, started to show signs of rupture in inorganic and organic chemistry: organic chemistry that initially studied the chemical properties of composites of animal and vegetal origin turned into the chemistry of carbon composites. The theoretical basis of classification did not need the vital force concept anymore^[32]. A different situation occurred in physiology; this subject was studying the alterations

Durante a primeira metade do século XIX, os químicos preocupados com a química humana, dos animais e plantas, eram ambivalentes em relação à existência de uma força vital e efetivamente adotaram uma posição de idealismo vitalista. Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) foi dos poucos que o registou de forma clara num relatório sobre a química animal que apresentou à Academia das Ciências Sueca em 1810, com a tradução inglesa publicada em 1818. Berzelius era um idealista vitalista quanto às origens da vida, mas um materialista quanto à composição dos animais e plantas e processos ocorridos nos organismos vivos. Um importante exemplo, é o seu conceito de “força catalítica”^[31]. A síntese da ureia por Friedrich Wöhler (1800-1882), em 1828, revelou-se um facto contraditório ao vitalismo químico e ajudou a refutá-lo. Ao mesmo tempo, forçou os vitalistas a repensarem e reajustarem a sua abordagem ao que a ciência tinha aprendido sobre a físico-química da vida. Esta experiência constitui um marco na história da bioquímica. A contradição que levanta só pôde ser resolvida pelo desenvolvimento dos seus aspectos químicos e biológicos. De facto, a química, até então unificada, começou a dar sinais de cisão, em química inorgânica e orgânica. A química orgânica, que inicialmente se ocupava das propriedades químicas dos compostos de origem animal e vegetal, tornava-se na química dos compostos de carbono. A base teórica da classificação já não precisava do conceito de força vital^[32]. Uma situação diferente se passava na fisiologia; esta disciplina estudava as alterações sofridas por aqueles compostos nos organismos vivos. Aqui, a controvérsia sobre força vital influenciava profundamente a explicação da natureza destas alterações.

Pelos primeiros anos do século XIX tinham sido descritas várias propriedades dos organismos vivos: movimento dos organismos, contractilidade dos músculos, excitabilidade dos nervos, sensibilidade e secreção, assim como a respiração nos animais, a fermentação na levedura e a fotossíntese. Estes fenómenos param com a morte ou quando a estrutura do órgão é rompida. Os fisiologistas tinham reconhecido a importância da organização, dependente de um princípio vital, princípio de toda a vida, “a totalidade das forças opostas à morte” segundo Xavier Bichat (1771-1802), 1802^[33]. Consideravam que as leis biológicas eram de uma ordem diferente das leis da física ou química. Em contraste com a hipótese organicista dos fisiologistas, Liebig acreditava que a força vital era uma força física que controlava a formação dos organismos vivos, opondo forças químicas que depois da morte conduziam à decomposição e putrefacção. Sendo os constituintes dos organismos vivos comuns aos elementos inorgânicos, dos quais o carbono era exemplo, mantinham-se unidos por forças fracas,

undergone by these composites in living organisms. Here, the controversy about vital force influenced profoundly the explanation of the nature of these changes.

In the first years of the 19th century various properties of living organisms had been described: movement of organisms, contractibility of muscles, excitement of the nerves, sensitivity and secretion, as well as respiration in animals, yeast fermentation and photosynthesis. These events end with death or when the organ's structure is broken. The physiologists recognised the importance of the system dependent on a vital principle, the principle of all life, “the totality of forces against death” as per Xavier Bichat (1771-1802), 1802^[33]. They considered the laws of biology to be of a different order from the laws of chemistry and physics. In opposition to the organizational hypothesis of the physiologists, Liebig believed that the vital force was a physical force that controlled the formation of living organisms, opposing chemical forces that after death would lead to decomposition and putrefaction. The constituents of living organisms, common to inorganic elements as carbon was, were maintained united by weak forces according to the laws of chemical affinity; as long as they were unprotected by the vital force of these constituents, in the presence of oxygen from the air, they would undergo molecular movements breaking the weak interactive forces^[18].

Phenomena of the chemistry of life: Photosynthesis, Oxidation, Respiration and Fermentation.

Superior plants are a source of oxygen, without which life, in its current state, would not be possible. The reason is due to the process called photosynthesis, which allows autotrophic organisms to achieve, using light, water, carbon dioxide and mineral ions, the synthesis of biologic compounds, producing O₂ derived from water.

At the end of the 18th century, the “new” chemistry had extended to the plants as shown by the Swiss, Nicolas de Saussure (1767-1845)^[34]. His analytical results in 1804 were the first ones to relate the volume of CO₂ absorbed with oxygen released during the process that will later be named photosynthesis. De Saussure traced the carbon in plants to CO₂ in the air, determining the carbon content of a mint plant watered with distilled water. Pierre-Joseph Pelletier (1788-1842) and Joseph-Bienaimé Caventou (1795-1877), two French chemists with a common interest in researching natural products, isolated in 1817 the green pigment of leaves and named it chlorophyll^[35]. The chemistry of the green part of plants revealed itself very difficult to research. Another important step was the discovery in 1837 by Hugo von Mohl (1805-1872), biologist and botanist, of the granular structure of chlorophyll and the association of starch with chlorophyll, as a result of the technical progress of the

seguindo as leis da afinidade química; se não se encontrassem protegidas pela força vital daqueles constituintes, estas forças interactivas, na presença de oxigénio do ar, sofriam movimentos moleculares, quebrando-se^[18].

Fenómenos da química da vida Fotossíntese, Oxidação, Respiração e Fermentação

As plantas superiores são uma fonte de oxigénio, sem as quais, a vida, no seu estado actual, não seria possível. A razão reside no processo designado fotossíntese, que permite aos organismos autotróficos realizarem a partir da luz, da água, do dióxido de carbono e de iões minerais a síntese dos compostos biológicos, com produção de O_2 proveniente da água.

Nos finais do século XVIII, a nova química era extensiva às plantas, como mostrou o químico suíço Nicolas de Saussure (1767-1845)^[34]. Os seus resultados analíticos, em 1804, são os primeiros que relacionam o volume de CO_2 absorvido e o de oxigénio libertado, durante o processo que se designará mais tarde fotossíntese. De Saussure traçou o carbono das plantas até ao CO_2 do ar, determinando o conteúdo em carbono da hortelã, regada com água destilada. Pierre-Joseph Pelletier (1788-1842) e Joseph-Bienaimé Caventou (1795-1877), químicos franceses com um interesse comum na investigação de produtos naturais, isolaram, em 1817, o pigmento verde das folhas e designaram-no por clorofila^[35], mas a química da parte verde das plantas revelou-se bem difícil de investigar. Outro passo importante foi a descoberta, pelo biólogo e botânico Hugo von Mohl (1805-72), da estrutura granular da clorofila e da associação de amido com clorofila, em 1837, em resultado do aperfeiçoamento técnico do microscópio, realizado por ele próprio. Berzelius suspeitou que um processo químico, de natureza catalítica, estivesse envolvido nesta associação, mas foi um fisiologista e botânico alemão, quem teve o mérito de relacionar a clorofila e a produção de amido, Julius von Sachs (1832-1897). Em 1862, Sachs observou que, para crescerem, apenas as plantas dependentes da luz reúnem amido nos grãos de clorofila das folhas. Também sugeriu que o amido, como substância de reserva das plantas, era o produto orgânico final de uma possível cadeia de transformações químicas, envolvendo inicialmente os compostos inorgânicos CO_2 e água^[36]. Interessantes foram as experiências de Theodor Wilhelm Engelmann (1843-1909), fisiologista seu compatriota, que demonstrou a relação da clorofila com a produção de O_2 , sob o efeito da luz^[37]. Ao microscópio as bactérias podiam ser vistas a moverem-se para os locais onde o oxigénio evoluía quando microorganismos como *Euglena*, uma alga, eram iluminados. A interacção da química e biologia está patente na identificação dos pigmentos das folhas, realizada por investigadores que aplicaram métodos físico-químicos às necessidades dos estudos biológicos. Assim, George Gabriel Stokes

microscope made by him. Berzelius suspected that a chemical process of a catalytic nature was implicated in this association but it was a German physiologist and botanist that had the merit of relating chlorophyll with the production of starch, Julius von Sachs (1832-1897). In 1862, Sachs observed that only plants dependent on light to grow gathered starch in grains of chlorophyll in the leaves. He also suggested that starch, as a reserve substance of plants, was the final organic product of a possible chemical transformation chain, involving initially the inorganic compounds CO_2 and water^[36]. Also interesting were the experiments of Theodor Wilhelm Engelmann (1843-1909), another German physiologist, who demonstrated the relation of chlorophyll with O_2 production under the effect of light^[37]; through the microscope the bacteria could be seen moving to the areas where the oxygen developed when microorganisms like alga *Euglena* were illuminated. The interaction of chemistry and biology is evident in the identification of leaf pigments executed by researchers that applied physical chemistry methods to biological studies requirements. Consequently, George Gabriel Stokes (1819-1903) announced in 1864 that the chlorophyll of green plants was a mixture of four components, two green and two yellow. Henry Clifton Sorby (1826-1908) confirmed the heterogeneous nature of the plants' coloration. These works were not appreciated at that point in time. However, the Russian botanist Mikhaïl Semenovitch Tsvett (1872-1919) considered that Sorby's work was excellent and continued to develop it, creating new techniques of separation applied specifically to the separation of chlorophylls^[38].

We have mentioned that chemical activities in plants were regarded as reductions and in animals as oxidations although they were considered related. In reality this way of thinking seemed to arise from concepts that substituted the cycle based on the phlogiston doctrine for a cycle that incorporated the oxygen theory. The cyclic way was conceived as dependent on the atmosphere to connect plants and animals, a reason why only the first did reductions and the last oxidations. It was in the plants' nature to remove, with the aid of sunlight, the carbonic anhydride expired by the animals and to renew the oxygen in the atmosphere. This cycle was presented by Dumas in an organic chemistry class in the previously mentioned School of Medicine^[16,39]. Researchers like Dumas and Liebig continued their chemical studies on the plants and animal's life, ignoring the cell's theory, proceeding experimentally in vitro and then extrapolating to physiological processes. However Liebig, based on his knowledge of chemical processes and research made by other authors proclaimed that the most important function of plants was the separation of carbon and oxygen from carbonic acid, resulting in carbon assimilation in compounds such as starch and oxygen release. He also demonstrated the importance of the

(1819-1903) anunciou em 1864 que a clorofila das plantas verdes era uma mistura de quatro componentes, dois verdes e dois amarelos. Henry Clifton Sorby (1826-1908) confirmou a natureza heterogênea da coloração das plantas. Estes trabalhos não foram muito apreciados na época; no entanto, o botânico russo Mikhaïl Semenovitch Tsvett (1872-1919) considerou o trabalho de Sorby exemplar, continuando a desenvolvê-lo e criando novas técnicas de separação entre elas a cromatografia precisamente aplicada à separação das clorofilas^[38].

Já referimos que as actividades químicas em plantas eram caracterizadas como sendo reduções e a dos animais como oxidações, embora se considerasse estarem relacionadas. Na realidade, esta linha de pensamento parece derivar de conceitos que substituíram o ciclo derivado da doutrina do flogisto, por um ciclo incorporando a teoria do oxigénio. A via cíclica foi concebida como dependente da atmosfera para a ligação entre plantas e animais, pelo que, as primeiras só realizavam reduções e os últimos oxidações. Era da natureza das plantas, com a ajuda da luz do Sol, remover o anidrido carbónico expirado pelos animais e renovar o oxigénio da atmosfera. Este ciclo foi apresentado por Dumas numa aula de química orgânica na escola de Medicina, já referida^[16,39]. Investigadores como Dumas e Liebig prosseguiram estudos químicos da vida das plantas e animais, ignorando a teoria das células; procediam experimentalmente no tubo de ensaio e extrapolavam para os processos fisiológicos. No entanto, Liebig, com base nos seus conhecimentos dos processos químicos e das investigações de outros autores, preconizou que a função mais importante das plantas seria a separação do carbono e oxigénio do ácido carbónico, com assimilação do carbono em compostos como o amido e libertação de oxigénio e demonstrou a importância dos sais minerais na agricultura; não identificou, contudo, a necessidade essencial do azoto. Esta foi estudada na Estação Experimental de Rothamsted, fundada em 1843, e constituiu o fundamento da utilização de adubos artificiais^[40]. Devemos salientar que Liebig realizou as análises de química agrícola em pequena escala e estava consciente de que seriam necessárias investigações em grande escala, como as que vieram a ser realizadas em Inglaterra, em Rothamsted, relatadas em *Organic Chemistry in Its Applications to Agriculture and Physiology*, com sete edições de 1840 a 1862, obra que veio mudar completamente a natureza do problema da agricultura científica. No entanto, a ideia da uniformidade dos processos a nível celular só foi aceite depois do estabelecimento da respiração intracelular (1875) por Eduard Pflüger, fisiologista alemão, professor em Bona. Entre 1840 e 1880, as expectativas de que o sangue constituísse o primeiro local de respiração oxidativa deram origem à convicção de que este processo deve ter lugar dentro

mineral salts in agriculture but nevertheless was unable to identify the essential need of nitrogen. This need for nitrogen was studied in the Experimental Station of Rothamsted, founded in 1843, and constituted the fundamentals of artificial fertilizer use^[40]. We have to highlight that Liebig completed the agrochemical analysis in small scale and that he was conscious that research at a large scale was required, as the ones done later on in Rothamsted, England. And also mention that it was really his book *Organic Chemistry in Its Applications to Agriculture and Physiology*, with seven editions from 1840 to 1862, which changed completely the nature of the problem in agricultural science. However, the idea of processes coherence at cellular level was only accepted after the establishment of intracellular respiration (1875) by Eduard Pflüger, a German physiologist that taught in Bona. Between 1840 and 1880 the expectations that the blood represented the first place for oxidative respiration produced the conviction that this process must take place in the organised tissues^[41]. Georg Liebig (1827-1903) had suggested in 1850, based on experiments made on a frog's muscles, that the respiration occurred in the muscular tissue and not in the capillaries. In 1861, Moritz Traube (1826-94), a wine merchant, that had studied chemistry with Liebig and was interested in scientific research in the area closest to his business, proposed a theory in which the oxygen passes dissolved through the capillary walls, merges poorly with the muscular fibre and then is transferred to other substances. By the 1870's it was recognized that in addition to the oxidation reactions, reduction processes also occurred in animals. In 1864, Hoppe-Seyler had named haemoglobin, the albuminoid ferruginous substance of the erythrocyte, while studying the toxic action of carbon monoxide when searching for the locus where respiration occurred. Studies made on haemoglobin did not lead, however, to the identification of this locus. He continued his research to develop the hypothesis that the oxidation-reduction reactions were the metabolism basis of animals and plants. Therefore, in 1876, Hoppe-Seyler identified the formation of biliary pigment urobilin and the production of succinic acid from asparagine, by reduction^[42]. Between 1872 and 1875, Eduard Pflüger showed that oxidative processes must take place in the tissues: one of his students replaced the blood of a frog with physiological serum and the animal continued to breathe. E. Pflüger was the first physiologist to formulate explicitly the theory of tissue cells as a respiration process area, highlighting the cell's need for oxygen. The oxygen would diffuse from the blood into the cells, oxidative process locus, according to their necessities. In his second article, Pflüger tried to generalize, suggesting that cellular respiration was a universal attribute of the vegetal and animal world. Only then a systematic study of cell chemistry was established, after the reformulation of

dos tecidos organizados^[41]. Georg Liebig (1827-1903) tinha sugerido, em 1850, com base em experimentação em músculos de rã, que a respiração tinha lugar no tecido muscular e não nos capilares. Em 1861, Moritz Traube (1826-94), comerciante de vinhos que tinha estudado química com Liebig e se interessava pela investigação científica da área afim dos seus negócios, propôs uma teoria segundo a qual, o oxigénio passa dissolvido através da parede dos capilares, combina-se fracamente com a fibra muscular e é depois transferido a outras substâncias. Pelos anos de 1870, reconheceu-se que, além das reacções de oxidação, também ocorriam processos de redução nos animais. Em 1864, Hoppe-Seyler tinha designado por hemoglobina a substância albuminóide e ferruginosa das hemácias, no decorrer do estudo da acção tóxica do monóxido de carbono, quando procurava o local onde se efectuava a respiração. Os estudos da hemoglobina não conduziram, no entanto, à identificação deste local. Prosseguiu as investigações para desenvolver a hipótese de que as reacções de oxidação-redução são a base do metabolismo animal e das plantas. Assim, em 1876, Hoppe-Seyler identificou a formação do pigmento biliar urobilina e a produção do ácido succínico a partir de asparagina, por redução^[42]. Entre 1872 e 1875, Eduard Pflüger demonstrava que os processos oxidativos devem ter lugar nos tecidos: um dos seus estudantes substituiu o sangue de uma rã por soro fisiológico e o animal continuava a respirar. Eduard Pflüger, foi o primeiro fisiologista a formular explicitamente a teoria celular, salientando a necessidade de oxigénio por parte da célula. O oxigénio difundir-se-ia do sangue para as células, loci do processo oxidativo, de acordo com as necessidades destas. No seu segundo artigo, Pflüger tentou generalizar, sugerindo que a respiração celular era uma propriedade universal dos mundos vegetal e animal. Só a partir desta data, se iniciou um estudo sistemático da química da célula, depois da reformulação do problema dos fenómenos da vida.

A interpretação do processo de fermentação pela levedura foi um dos mais controversos temas para os vitalistas; a sua resolução foi fundamental para o desenvolvimento da bioquímica. No princípio do século XIX, a fermentação estava relacionada com putrefacção e decomposição. Gay-Lussac (1778-1850) provou que a fermentação era condicionada pela presença de ar (oxigénio), publicando os resultados em 1810. Em 1833, dois químicos franceses, Anselme Payen (1795-1871) e Jean-François Persoz (1805-1868) conseguiram, pelo tratamento com álcool, separar do extracto de malte um precipitado termolábil capaz de desdobrar o amido e deram-lhe o nome de diastase. Os seus estudos eram fruto da preocupação em aplicar os conhecimentos científicos à prática industrial do fabrico de cerveja. Berzelius, reflectindo na participação catalítica da diastase na conversão do amido das plantas, terá pensado nas reacções catalíticas

the phenomena of life's problematic.

The interpretation of the fermentation process through yeast was one of the most controversial subjects for vitalists. Its solution was fundamental to the development of biochemistry. At the beginning of the 19th century, fermentation was related to putrefaction and decomposition. Gay-Lussac (1778-1850) proved that fermentation was conditioned by the presence of air (oxygen), publishing the results in 1810. In 1833 two French chemists, Anselme Payen (1795-1871) and Jean-François Persoz (1805-1868) achieved, by alcohol treatment, the separation of a thermolabile precipitate from malt extract. The thermolabile precipitate, that was able to transform starch into sugar, was named diastase. Their studies resulted from the concern in applying scientific knowledge to industrial use of beer production. Berzelius while reflecting on the diastase catalytic participation in plant's starch conversion would have thought of catalytic reactions as an important part of the chemistry of life. He severely criticised the hypothesis that alcohol fermentation was due to yeast; he saw in this supposition an influence of *Naturphilosophie* on science. In his opinion, fermentation was due to a catalytic force inherent to yeast, with the same function as inorganic catalysers.

As previously mentioned all chemists rejected the idea that fermentation was associated with life. On the contrary Liebig, ignoring the microscope existence, defended that fermentation was purely a chemical process, by comparison with putrefaction of organic compounds, which had ceased to live. Therefore it was seen as a spontaneous chemical alteration, similar to slow combustion, affecting nitrogenous organic substances separated from living organisms. Liebig considered it the result of a rupture of a sugar following the air entrance in the azo-compounds of yeast extracts. The fermentation research progressed; the opposite of what happened to cellular respiration, independently of the cell theory until M. Traube considered yeasts as compounds of defined composition, derivatives of proteins. He treated them as oxygen transporters and suggested, in an article published in 1858, that the oxidation and reduction processes in living organisms are in the nature of fermentation.

Traube also applied this concept to the explanation of the chemical relationship between respiration and muscular work in an article published in 1861; he demonstrated that the allegation made by Liebig about the nitrogenous origin of muscular work was open for discussion. Traube clearly declared that the muscular work was a respiration act. In reality, he looked at the maintenance of muscular activity as the main function of respiration activity (others being cell formation and heat production)^[43]. But the beginning of what would be conclusive evidence against Liebig's fermentation perspective came up from microscopic observations

como uma parte importante da química da vida. Criticou severamente a hipótese da fermentação alcoólica ser devida à acção de uma levedura; via nesta hipótese uma influência da *Naturphilosophie* sobre a ciência. Para ele, a fermentação devia-se a uma força catalítica inerente à levedura, com função idêntica à dos catalisadores inorgânicos.

Já vimos que a maioria dos químicos rejeitava a ideia de que a fermentação tivesse alguma relação com vida; pelo contrário, Liebig, ignorando a existência do microscópio, defendia que a fermentação era um processo puramente químico, por analogia com a putrefacção dos compostos orgânicos, que tinham cessado de viver; assim, esta era vista como uma alteração química espontânea, semelhante à combustão lenta, afectando substâncias orgânicas nitrogenadas, separadas dos organismos vivos. Liebig considerava-a um resultado da ruptura de um açúcar, a seguir à entrada de ar nos componentes azotados dos extractos de levedura, e os químicos tendiam a segui-lo.

Ao contrário da respiração celular, o estudo da fermentação desenvolveu-se independentemente da teoria das células, até M. Traube considerar os fermentos como sendo compostos de composição definida, derivados das proteínas. Tratou-os como transportadores de oxigénio e sugeriu que os processos de oxidação e redução nos organismos vivos tinham uma natureza idêntica à da fermentação, num artigo publicado em 1858.

Traube também aplicou este conceito à elucidação da relação química entre respiração e trabalho muscular, num artigo publicado em 1861; mostrou que a asserção de Liebig da origem nitrogenada do trabalho muscular estava aberta a discussão. Traube enunciou claramente que trabalho muscular é um acto de respiração. Na verdade, olhou a manutenção da actividade muscular como a função principal da respiração (as outras sendo a formação de células e a produção de calor)^[43]. Mas o início do que se provaria ser evidência conclusiva contra a perspectiva de Liebig da fermentação veio de observações ao microscópio tornadas possíveis pelos novos aperfeiçoamentos ópticos, como já referimos. Entre 1835 e 1837, Cagniard de Latour concluiu, das suas observações com os novos microscópios, que a levedura era composta por glóbulos que se reproduziam, sendo a reprodução uma característica da matéria viva. Pela ausência de locomoção deduziu serem de origem vegetal^[44]. Foi pelo estudo da geração espontânea que Schwann obteve um indício de entendimento da fermentação. Demonstrou que se o ar em contacto com infusões orgânicas fosse aquecido, não havia microorganismos nas infusões e a matéria orgânica não se decompunha, interpretando que era o ar que continha estes germes, e estes eram destruídos pelo calor. Também entendeu que a putrefacção correspondia ao facto de estes germes se alimentarem

only possible with the new optic progresses already mentioned: Cagniard de Latour, in his observations with new microscopes between 1835 and 1837, concluded that yeast consisted of reproductive globules, the reproduction being a characteristic of living matter. By its lack of locomotion he deduced that it had vegetal origin^[44]. It was while studying the spontaneous generation that Schwann obtained the clue to understanding fermentation. He demonstrated that if the air when in contact with organic infusions was warmed up, there were no microorganisms in the infusions and the organic matter would not decompose. This meant, in his opinion, that it was the air that contained these germs and these were killed by heat. He also understood that putrefaction corresponded to the fact that these germs fed on the organic substance, which would decompose in the process; he related putrefaction, due to the microorganisms' activity, to the study of respiration and fermentation. He concluded that alcohol fermentation was promoted by the proliferation of yeast organisms, which he named *sugar fungus*.

In the second half of the 19th century, there was a strong upsurge in favour of the biology in fermentation, a consequence of Pasteur's works. Pasteur's experiments, between 1860 and 1864, confirmed the first experiments made by Schwann and demonstrated that pre-heated yeast infusions continued to be aseptic if not contaminated after getting cold^[45]. This resulted in the abandonment of the spontaneous generation idea. Since the end of the 18th century, fermentation research had been marked by attempts to see it in oxygen participation terms. But it was only after Pasteur considered the nature of the relationship between fermentation by yeast action and oxidation that the subject was clarified. Pasteur argued that under aerobic conditions yeast would behave as a plant and under anaerobic condition it would act as a fermenting agent with reactions dependent on a vital force. He was able to demonstrate in 1861 that there was an interdependent quantitative relationship between the two processes: the quantity of decomposed sugar by the quantity unit of yeast depended on the fermentation-taking place in the absence of oxygen^[6]. It is important to mention that Pasteur, at the end of the 1840's, had separated enantiomorphic crystals of sodium tartrate and ammonium. He considered that the capacity to induce optical activity was a characteristic restricted to living beings, "maybe, establishing the only demarcation line between the chemistry of living beings and dead matter"^[46]. In accordance with Bernardo Herold, he must have recognised the molecular nature of life at the beginning of his professional career, which permitted him later on to relate molecular asymmetry, optical activity and a biological concept of fermentation^[47].

In the past inconclusive efforts were made in order

à custa da substância orgânica, decompondo-se esta, no processo e relacionou a putrefacção, devida à actividade de microorganismos, com o estudo da respiração e fermentação. Concluiu que a fermentação alcoólica era promovida pela proliferação de organismos da levedura, designados por ele como fungos do açúcar.

Na segunda metade do século XIX, fez-se sentir uma forte contra-corrente a favor da explicação biológica da fermentação, consequência dos trabalhos de Pasteur. As experiências de Pasteur, realizadas entre 1860 e 1864, confirmaram as primeiras experiências de Schwann e mostraram que as infusões de levedura pré-aquecidas continuavam assépticas a menos que fossem contaminadas depois de arrefecidas^[45]. Abandonava-se, assim, a ideia de geração espontânea. Desde o fim do século XVIII que o estudo da fermentação tinha sido marcado por tentativas desta ser olhada em termos de participação do oxigénio. Mas só depois de Pasteur ter considerado a natureza da relação entre fermentação por acção da levedura e oxidação foi o assunto mais clarificado. Pasteur argumentava que sob condições aeróbias a levedura se comporta como uma planta e em condições anaeróbias actua como um fermento, com efeitos dependentes duma força vital. Foi capaz de demonstrar, em 1861, que existia uma interdependência quantitativa entre os dois processos: a quantidade de açúcar decomposta pela unidade de quantidade de levedura dependia da fermentação ter lugar na ausência de oxigénio^[6]. Convém lembrar que Pasteur, no final da década de 1840, tinha separado cristais enantiomórficos de tartarato de sódio e amónio. Considerou que a capacidade de induzir actividade óptica era uma característica exclusiva dos seres vivos, “talvez, estabelecendo a única linha de demarcação entre a química dos seres vivos e da matéria morta”^[46]. De acordo com Bernardo Herold, terá reconhecido a natureza molecular da vida no início da sua carreira profissional, o que lhe permitiu mais tarde relacionar assimetria molecular, actividade óptica e uma concepção biológica da fermentação^[47].

No passado, tinham sido inconcludentes os esforços no sentido de decidir entre as concepções química e biológica da fermentação alcoólica, utilizando um extracto de levedura.

Reverendo as teorias da fermentação antes das experiências de Eduard Buchner (1860-1917) (Fig.1)^[48], vemos que para Liebig “A levedura produz fermentação em consequência da progressiva decomposição que sofre da acção do ar e da água...durante a fermentação do açúcar pela levedura ambos sofrem decomposição e desaparecem, em consequência”^[6]; conservou esta perspectiva até ao fim da vida, perspectiva fundamentada em experimentação realizada por ele e F. Wöhler, em 1836, em que a amigdalina extraída das amêndoas era convertida em óleo, por intermédio de matéria azotada presente na pele da amêndoa — a emulsina; a decomposição desta

to decide between the chemical and biological conceptions of alcohol fermentation, using yeast extract.

Reviewing the fermentation theories before the experiments made by Eduard Buchner (1860-1917) (Fig.1)^[48] we realize that for Liebig “The yeast produces fermentation as a consequence of the progressive decomposition that it suffers from air and water action... during the fermentation of sugar by yeast both suffer decomposition and disappear as a consequence”; he maintained this perspective until the end of his life. A perspective based on an experiment made by him and F. Wöhler, in 1836, in which the amygdaline extracted from almonds was converted into oil, by intervention of the nitrogenous matter present on the skin of the almond; its decomposition was responsible for the decomposition of the amygdaline. Similarly they assumed that sugar was transformed into alcohol because the albuminous matter of yeast decomposed. Pasteur did not wish to involve the microorganisms' action in the production of almond oil, the opposite really as he did not recognise this fermentation research as being in fact fermentation. Basically, he ignored the transformations in which a natural product was decomposed by the presence of albuminous matter; they were not “real” fermentations, although involving important alterations such as sugar production from starch by using a barley shoot extract. Later on, it was known that these alterations were produced by non-organised ferments, while Pasteur's fermentations were produced by organised ferments (e.g. living microorganisms). Pasteur ignored the first and concentrated on the last. Liebig that had started exploring the first type ignored the results obtained by Pasteur.

This Liebig-Pasteur controversy is interesting as it illustrates the difficulties in term definition in the first phases of any science: in the case of “fermentation” and “true fermentation”. The only difference that Pasteur raised was the molecular alterations being more drastic in “true fermentations”. But the distinction was not clear. We know now that the almond oil production is an example of an alteration produced by an enzyme that is easily removed from cells; alterations from sugar to alcohol or sugar to lactic acid and all Pasteur's “true transformations” are produced by enzymes, that in normal conditions would not leave the cell. The alterations only occur in that case, in the presence of living cells.

The interest shown by Buchner for fermentation originated from his student days at Munich's University where he continued his studies in 1884 with Liebig's successor, Adolf von Baeyer (1835-1917). In 1885 he resolved to examine this question using bacteria instead of yeast. The results were not opposite

era responsável pela conversão da amigdalina. Analogamente, supunham que o açúcar era transformado em álcool porque a matéria albuminosa da levedura se decompunha. Pasteur não pretendeu envolver a acção de microorganismos na formação do óleo de amêndoa; ao contrário, não reconhecia estes estudos de fermentação como sendo de facto, fermentação. Essencialmente, ignorava as transformações nas quais um produto natural era decomposto pela presença de matéria albuminosa. Para ele, não eram “verdadeiras fermentações”, embora envolvessem alterações importantes, como a produção de açúcar, a partir de amido, por acção de um extracto de rebento de cevada. Mais tarde estas alterações vieram a ser conhecidas como produzidas por fermentos não organizados, enquanto as fermentações de Pasteur eram produzidas por fermentos organizados (i.e. microorganismos vivos). Pasteur concentrou-se nestes últimos e ignorou os primeiros. Liebig, que tinha começado a explorar os primeiros, ignorou os resultados obtidos por Pasteur.

Esta controvérsia Liebig-Pasteur é interessante por ilustrar as dificuldades na definição dos termos nas primeiras fases de uma ciência: no caso, fermentação e “fermentação verdadeira”. A única diferença que Pasteur invocou era a de as alterações moleculares serem mais drásticas nas “fermentações verdadeiras”. Mas a distinção não era clara. Sabemos hoje que a formação de óleo de amêndoa é um exemplo de uma alteração produzida por uma enzima que é facilmente removida das células; a alteração de açúcar a álcool ou de açúcar a ácido láctico e todas as “transformações verdadeiras” de Pasteur são produzidas por enzimas que em condições normais não deixam a célula. As alterações só ocorrem, então, em presença das células vivas.

O interesse de Buchner pela fermentação vinha do tempo de estudante na Universidade de Munique, onde continuou a estudar, em 1884, com o sucessor de Liebig, Adolf von Baeyer (1835-1917). Em 1885, resolveu examinar esta questão usando bactérias em vez de levedura. Os resultados foram ao encontro dos obtidos por Pasteur. Mostraram que na presença de oxigénio as bactérias se propagam e a actividade de fermentação era reduzida (calculada por célula). Percebendo que o problema consistia na obtenção do conteúdo celular da levedura, sem afectar o seu estado químico, Buchner experimentou vários processos de rompimento das células de levedura. As experiências só foram continuadas em 1894 e, finalmente, em 1897, submetendo a levedura a pressão elevada e adicionando açúcar como conservante, conseguia obter um extracto de leveduras capaz de promover a fermentação. A fermentação parecia produzida por uma substância proteica, contida no extracto de leveduras, com propriedades de enzima, que Buchner



Figura 1 - Eduard Buchner (1860-1917), *The Nobel Foundation*.

Figure 1 - Eduard Buchner (1860-1917), *The Nobel Foundation*.

of those obtained by Pasteur. It showed that in the presence of oxygen bacteria proliferate and the fermentation activity was small (calculated per cell). Understanding that the problem consisted in obtaining yeast cellular content without disturbing its chemical constitution, Buchner tried various processes of yeast cell rupture. The experiments were only resumed in 1894, and finally in 1897, by submitting yeast to a high pressure and adding sugar as a preservative, it was possible to obtain a yeast extract able to promote fermentation. The fermentation seemed to be produced by a proteinous substance with enzyme characteristics, contained in the yeast extract and called by Buchner zymase. Buchner received the Nobel Prize in Chemistry in 1907. It was due to this observation that A. Kornberg chose, in 1997, to publish his article “Centenary of the birth of Biochemistry” on the anniversary year of the creation of a bridge between chemistry and biology^[49]. The discovery of fermentation in a system deprived of cells finally permitted the reconstruction, in molecular terms, of alcohol fermentation and constituted the study base of intermediary metabolism.

alcoólica e constituiu a base do estudo do metabolismo intermediário.

Conclusão

No princípio do século XIX, muitos cientistas estiveram envolvidos no estudo de compostos biológicos. Vários destes compostos tinham sido identificados em plantas e animais; alguns eram designados por compostos orgânicos, porque se acreditava só poderem ser sintetizados no organismo por influência de uma força vital.

Liebig forneceu um dos primeiros enquadramentos da totalidade das reacções químicas que formavam parte integrante do processo vital. O seu trabalho estimulou a incorporação da química na fisiologia e a publicação dos livros *Organic Chemistry in Its Applications to Agriculture and Physiology* e *Animal Chemistry*, entusiasmou jovens médicos para quem a sua teoria de acção molecular estabelecia um conceito flexível de causa da fermentação e da putrefacção, a par das causas de doenças (uma forma de putrefacção)^[50].

Pelos anos de 1850, a química fisiológica emergia mais ligada à fisiologia do que à química, mas Hoppe-Seyler, durante os anos que trabalhou em Estrasburgo (1872-95), tornou-se o protagonista da transformação da química fisiológica em bioquímica.

O debate sobre o conceito de enzima girou em torno do processo pelo qual a levedura fermenta a glucose, transformando-a em álcool e anidrido carbónico. Para Liebig, as reacções de fermentação não eram excepção à explicação química, enquanto para Pasteur as reacções de fermentação exigiam a hipótese vitalista. Pasteur nunca tentou incorporar na sua teoria a fermentação não vitalista da amigdalina pela emulsina. A controvérsia Liebig-Pasteur continuou a um nível verbal, devido à ausência de resultados comprovativos, até 1897, com a experiência de Eduard Buchner; esta refutava a tese de fermentação de Pasteur, segundo a qual era necessário um agente vivo. A investigação passou a fazer-se, em geral, com homogenatos. É este o ponto de viragem que deu lugar à bioquímica tal como veio a ser entendida no século XX. Os estudos da disciplina no decorrer do século revelariam a sua universalidade.

Olhando em retrospectiva para a interacção entre química e biologia no século XIX, é claro que os limites da explicação molecular dos fenómenos biológicos eram impostos pelo estado do conhecimento químico contemporâneo. Ainda hoje é assim, constituindo a química do cérebro apenas um exemplo^[14]; a contribuição da química na biologia continuará no futuro, embora a importância da química como fundamento das ciências médicas e biológicas não seja geralmente apreciada. Alguns investigadores contrapõem que a análise química não poderá distinguir a complexa integração necessária Organização específica e ao propósito de

Conclusion

All accounts agree that by the first decade of the 19th century many scientists were engaged in the study of the chemistry of life. A number of immediate principles had been identified in plants and animals; some of them were called organic substances because they were believed to be made under the influence of the vital force of organized living matter.

Liebig provided one of the first comprehensive pictures of the overall chemical exchanges that form an integral part of the vital process. His work stimulated the incorporation of chemistry into physiology and the publication of his books *Organic Chemistry in Its Application to Agriculture and Physiology* and *Animal Chemistry* aroused widespread enthusiasm among medical practitioners for whom Liebig's theory of continuous molecular action established a flexible concept of the cause of fermentation and putrefaction as well as of disease (a form of putrefaction)^[50]. By 1850, physiological chemistry had emerged more closely linked to medical physiology than to pure chemistry, but during his years in Strasbourg, Hoppe-Seyler became the leading protagonist of the transformation of physiological chemistry into biochemistry.

Much of the debate about the enzyme theory of life revolved about the process whereby yeast ferments glucose to alcohol and carbon dioxide. For Liebig, fermentation reactions constituted no exception to the ever-present ideal of chemical explanation, while for Pasteur the phenomena of alcohol fermentation were inexplicable without resorting to a vitalist hypothesis. He never attempted to incorporate within his theory the non-vitalist fermentation of amygdaline by emulsin.

The Liebig-Pasteur controversy continued on the verbal level, owing to the absence of further corroborating evidence until 1897, when Eduard Buchner's evidence was brought to light. Pasteur's basic thesis that fermentation could never take place without the presence of a living agent was disproved; research would be conducted by working on homogenates. This was the turning point of the origin of modern biochemistry as the discipline was understood in 20th century. Further studies of this biomedical science would reveal its universality. Looking back on the interplay of chemistry and biology in the 19th century it is clear that the limits of molecular explanation of biological phenomena were set by the state of contemporary chemical knowledge. This is still true today, brain chemistry being only an example^[14]; the contribution of chemistry to biology is likely to continue in the future, although the importance of chemistry as the foundation of all medical and biological sciences may not be commonly appreciated. Some will object that the efforts to explain the phenomena of life in terms of specific chemical properties of given compounds as

comportamento dos seres vivos. Mas há mais confiança hoje do que no princípio do século XX no poder da química para resolver novos problemas biológicos, e isto é uma consequência do processo de interações anteriores entre muitos químicos e muitos biólogos, processo que tentámos resumir nesta revisão da génese da bioquímica.

enzymes or nucleic acids are doomed to fail because biochemical analysis cannot discern the complex integration necessary for specific organization and for the purposeful behaviour of living organisms. But there is more confidence today than at the beginning of the 20th century in the power of chemistry to solve novel biological problems and this is a consequence of the fruitful interaction of many chemists and many biologists that we have tried to summarize in this brief review on the emergence of the biochemistry.

Bibliografia / References

- [1] Holmes FL. Between Biology and Medicine: The formation of intermediary metabolism. Berkeley: Office for History of Science and Technology, UCB; 1992. P.20-24.
- [2] Teich M with Needham DM. A documentary History of Biochemistry, 1770-1940. Rutheford: Fairleigh Dickinson University Press; 1992. P.499-500.
- [3] Ibid, p.498.
- [4] Fruton JS. A Skeptical Biochemist. Cambridge: Harvard University Press; 1992. P.75-77.
- [5] Holmes FL. Between Biology and Medicine: The formation of intermediary metabolism. Berkeley: Office for History of Science and Technology, UCB; 1992. P.27
- [6] Conant JB. Harvard Case Histories in Experimental Science. Vol.2, case 6, Cambridge: Harvard University Press. 1957. 439-485
- [7] Carneiro A, Nunes dos Santos AM. Louis Pasteur (1822-1895) Homenagem no centenário da sua morte. Química 1995; 59: 8-15.
- [8] Geison GL. Artigo Louis Pasteur, em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 10: 350-416.
- [9] Rothschild KE. Artigo Eduard FW Pflüger, em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 10: 578-581.
- [10] Teich M with Needham DM. A documentary History of Biochemistry, 1770-1940. Rutheford: Fairleigh Dickinson University Press. 1992. p.128-130.
- [11] Schrievers II. Artigo Eduard Buchner, em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 2: 560-563.
- [12] Kohler RE. The History of Biochemistry: A Survey. *J Hist Biol* 1975; 8:2, 275-318.
- [13] Amaral I. As Escolas de Investigação de Marck Athias e de Kurt Jacobson e a Emergência da Bioquímica em Portugal. Lisboa: Tese de doutoramento; 2001. FCT Universidade Nova de Lisboa.
- [14] Kornberg A. The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* 1987; 26: 6888-6891.
- [15] Ord MG and Stocken LA. Foundations of Modern Biochemistry. Vol. I, Connecticut: JAI Press; 1995. P.9-10.
- [16] Holmes FL. Between Biology and Medicine: The formation of intermediary metabolism. Berkeley: Office for History of Science and Technology, UCB; 1992. p.11-12.
- [17] Ibid, p.29.
- [18] Rosenfeld L. Justus Liebig and Animal Chemistry. *Clin Chem*, 2003; 49:1696-1707.
- [19] Gmerk MD. Artigo Claude Bernard em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 2, 24-34.
- [20] Duris P, Gohau G. Histoire des Sciences de la Vie. Paris : Ed. Nathan; 1997. p.263.
- [21] Holmes FL. Between Biology and Medicine: The formation of intermediary metabolism. Berkeley: Office for History of Science and Technology, UCB; 1992. p.12-13.
- [22] Ibid, p.15.
- [23] Kauffman GB. Artigo Heinrich Gustav Magnus em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 9,18-19.
- [24] Holmes FL. Investigative Pathways Patterns and Stages in the careers of Experimental Scientists. New Haven & London: Yale Univ. Press, 2004. p.63.
- [25] Kruta V. Artigo René-Joachim-Henri Dutrochet em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 4, 263-265.
- [26] Stearn WT. Artigo Robert Brown em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 2, 516-522.
- [27] Ord MG and Stocken LA. Foundations of Modern Biochemistry. Vol. I, Connecticut: JAI Press; 1995. p.12-13.
- [28] Teich M with Needham DM. A documentary History of Biochemistry, 1770-1940. Rutheford: Fairleigh Dickinson Univ. Press; 1992. p.460-461.

- [29] Florkin M. Artigo Theodor Ambrose Hubert Schwann, em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 12, 240-245.
- [30] Holmes FL. Between Biology and Medicine: The formation of intermediary metabolism. Berkeley: Office for History of Science and Technology, UCB; 1992. p.30-31.
- [31] Leicester HM. Artigo Jöns Jacob Berzelius em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 2,90-97.
- [32] Teich M with Needham DM. A documentary History of Biochemistry, 1770-1940. Rutheford: Fairleigh Dickinson University Press; 1992. p.452-453.
- [33] Canguilhem G. Artigo Marie-François-Xavier Bichat em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 2, 122-123.
- [34] Pilet PE.,Artigo Nicolas-Théodore de Saussure em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 12, 123-124.
- [35] Duris P, Gohau G. Histoire des Sciences de la Vie. Paris : Ed. Nathan; 1997. p.268-270.
- [36] Bopp M. Artigo Julius Von Sachs em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 12, 58-60.
- [37] Rothsuh KE. Artigo Theodor Wilhelm Engelmann em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York, 1970-80. 4, 371-373.
- [38] Senchenkova EM. Artigo Mikhail Semenovitch Tsvet em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 13, 486-489.
- [39] Teich M with Needham DM. A documentary History of Biochemistry, 1770-1940. Rutheford: Fairleigh Dickinson University Press; 1992. p.465-467.
- [40] Holmes FL. Artigo Justus Von Liebig em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 8, 329-350.
- [41] Fruton JS. The Emergence of Biochemistry. Science 1976; 192: 327-3334.
- [42] Fruton JS. Artigo Felix Hoppe-Seyler, em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 6, 504-506.
- [43] Rudolph G. Artigo Moritz Traube em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80. 13,451-453.
- [44] Payen J. Artigo Charles Cagniard de la Tour em C. Gillispie ed. *Dictionary of Scientific Biography*, N. York: 1970-80; 3, 8-10.
- [45] Latour B. Pasteur e Pouchet: heterogênese da história das ciências. Em M. Serres ed. Elementos para uma História das Ciências. Vol. III, Lisboa: Terramar; 1996. p.49-76
- [46] Geison GL. The Private Science of Louis Pasteur. New Jersey: Princeton, University Press; 1995. p.95-103.
- [47] Herold BJ. Pasteur e a “dissemetria” molecular. Colóquio/Ciências 1996; 18: 13-24
- [48] <http://www.nobelprize.org/chemistry/laureates/1907/buchner-bio.html>, acedido em 29/10/05.
- [49] Kornberg A. Centenary of the birth of modern biochemistry, Faseb 1997; 11, 1209-1214.
- [50] Brock, WH. Artigo The Biochemical Tradition. Em Bynum WF, Porter R ed. Companion Encyclopaedia of The History of Medicine. vol.I London: Routledge; 1993. p.153- 168.