

**J. BAETA VIANNA**

m. d. F. MEDICINA B. HORIZONTE

# THESE

Apresentada á Faculdade de Medicina de B. Horizonte, em  
concorrência ao lugar de professor substituto da cadeira de  
Chimica Medica.

Contribuição á microchimica des lipoides

E

Novo processo de microdosagem da cholesterina

COM APPLICAÇÕES Á BIOLOGIA

Trabalho do Posto Experimental de Veterinaria  
de Bello Horizonte



BELLO HORIZONTE  
IMPrensa OFFICIAL

1922

G. 3.806

**J. BAETA VIANNA**

m. d. F. MEDICINA B. HORIZONTE

# THESE

Apresentada á Faculdade de Medicina de B. Horizonte, em  
concurancia ao logar de professor substituto da cadeira de  
Chimica Medica.

Contribuição á microchimica dos lipoides

E

Novo processo de microdosagem da cholesterina

COM APPLICAÇÕES Á BIOLOGIA

Trabalho do Posto Experimental de Veterinaria  
de Bello Horizonte



BELLO HORIZONTE  
IMPrensa OFFICIAL  
1922

G. 3.806

*C. A. de F. L.*

## Introdução

---

O trabalho que apresentamos é apenas uma parte dos nossos longos estudos neste terreno.

A rapidez com que o compomos, proximo á sua publicação, não nos permittio expurgal-o de deficiencias que elle as tem e não poucas. Não temos a pretensão de ser completos, tão pouco a de originalidade foi um dos motivos que preocuparam a sua elaboração.

Si alguma cousa fizemos que não sabiamos feita alhures, trouxe-nos a sequencia logica dos factos a se desdobrarem por força de raciocinios.

Assumptos de palpitante actualidade — lipoides e microchimica—os de que tratamos, tivemos que procural-os na sua origem. O movimento scientifico iniciado na Allemanha, ha poucos annos, só encontrou repercussão nos E. Unidos da America. A litteratura franceza é de uma lamentavel mediocridade em ambos os terrenos, sobretudo no ultimo, o que se explica pela sua pouca actividade no terreno da chimica biologica.

A pobreza dos nossos laboratorios, não permittindo a applicação de taes methodos, senão um numero limitado de processos que independam dos seus ultrasensíveis apparatus de medida, tem cumulado de difficuldades o curso das nossas pesquisas.

Não tratariamos aqui de materia que parece escapar ás preocupações ordinarias da chimica, se não fosse connexa á da nossa these.

Em chimica biologica, eu penso, não existe assumpto por menos extenso que pareça, que se não ramifique indefinidamente a caminho de terreno desconhecido, que não receba no seu curso tributarios desertos de conhecimentos, a cujas aguas se ajunta para o marmagnun da nossa ignorancia—a vida.

.....

Devemos aos professores Magalhães Gomes e Alfredo Schaeffer o estímulo inicial para os estudos de chimica; a Cicero Ferreira, a afirmação imperiosa do nosso destino.

Delle receberamos a primeira e a mais preciosa contribuição para os estudos de que faz parte esta these—dois volumosos blocos de papel contendo uma traducção do allemão (Biochemie der Lipoide, Y. Bang) feita ao seu proprio punho, quando ainda não nos achavámos em condições de proceder uma leitura no original.

Guardamol-a religiosamente. A impressão que em nós causara os trabalhos de Bang deu azas ao nosso pensamento e rumo ás nossas investigações scientificas, neste terreno. Por isso mesmo, eu não saberia produzir o que fosse relativo ao assumpto, sem uma previa dedicatória ao inolvidavel mestre e amigo. Ficam aqui os nossos agradecimentos ao professor H. M. Lisbôa, esta cerebração privilegiada que todos nós nos habituamos a admirar e em cuja convivencia eu me sinto orgulhoso e feliz; ao professor Annibal, pelo espontaneo interesse que mostra pelos nossos trabalhos, e ao nosso companheiro de trabalho Aggêo Pio Sobrinho pelo muito que contribuiu com sua operosidade, dedicação e competencia.

*J. Baeta Vianna.*

B. H.—2—X—922.

No limiar do nosso trabalho, um problema se nos apresenta á reflexão e imperiosamente nos conduz a solucionar-o em pratica, antes de proseguirmos na colheita de documentos analyticos.

Trata-se aqui da coagulação sanguinea em um dos seus innumerados aspectos, tanto quanto possivel evitando participar das suas interminaveis discussões para considerar-a no ponto de vista das consequencias que pode ter sobre alguns dos constituintes normaes do plasma.

A preocupação dominante de quasi todos os que a têm estudado, senão a sua totalidade, é antes explicar-lhe o mecanismo que controlar modificações humoraes ocasionadas pelo phenomeno.

Como o assumpto nos parecesse digno de cogitações, porque não sabemos alguém se occupasse delle antes de nós, trouxemos-o para aqui, acompanhando-o de algumas provas, apezar de infelizmente incompletas.

Consiste o nosso modo de ver em:

a) que as dosagens das substancias normalmente colloidaes do plasma, em rigor, dão resultados falsos, quando effectuadas no sôro;

b) que as dosagens da maior parte dos crystalloides podem ser realizadas indifferentemente no plasma ou no sôro com resultados comparaveis;

c) qualquer que seja a dosagem, o plasma é preferivel ao sôro.

Concebemos theoreticamente a verdade destes itens, mas as difficuldades materiaes que cumulam a resolução

de um tão vasto problema não nos permitem uma resposta immediata.

A escolha de processos pelos quaes aferissemos o theor de cada um dos principaes componentes do sangue é trabalho que nos tem devorado tempo e paciencia e quanta vez solicitado tentativas que muitas dellas terminam improficuas.

O chimismo do meio interior, ainda pleno de incertezas, não permittiria aventurarmos a taes conceitos, se conhecimentos theoricos e praticos actuaes não pleiteassem francamente connosco.

Por todos os motivos, estamos convencidos delles.

Mas, para que não nos coubesse a censura de ajuizar apressadamente, aventurando-nos a generalisações infundadas, realizamos algumas experiencias, appellamos para os nossos raciocinios e relembramos factos adquiridos, para que comprovem todos o nosso modo de ver.

Estudando o chimismo do sangue, sob o ponto de vista quantitativo, impressionara-nos vivamente o desacordo dos resultados colhidos por varios analyistas, trabalhando com mais ou menos os mesmos processos.

A razão parece estar, não tanto nas variações da technica individual, quanto na indeterminação das condições que precedem as dosagens.

Raramente, levam-se em linha de conta circumstancias que influem sobre resultados analyticos, taes como regimen alimentar e momento da retirada do material, apezar de sua importancia constituir um facto physiologico plenamente adquirido.

Estas condições, porém, independem frequentemente do analysta, não assim as dosagens dos seus componentes chimicos que são feitas indifferentemente no plasma, no sôro e não raras vezes no sangue.

Pensamos que apenas um numero limitado de dosagens poderá ser feito no sangue total, porque a diversidade de composição dos globulos e do plasma, assim como as variações de ordem especifica e numerica dos primeiros, não permitem se estabeleça sobre taes dados analyticos uma razão physiologica proveitosa, pelo menos emquanto não se conhece precisamente a correlacção chimica qualitativa e quantitativa entre plasma e globulos, para que se possa exprimir uma em funcção de outra.

Regra geral, os autores não se fazem preceder dos motivos que os determinam preferir sangue ao plasma e este ao sôro.

Forçosamente, encontra-se ahi uma das parcelas que se somam para o desencontro dos resultados.

E' aqui que reside a nossa objecção. Achamos que o material destinado á analyse se deveria preservar melhor contra modificações que ordinariamente lhe sobrevem *in vitro*.

Referimo-nos á coagulação e outras acções de fermentos.

Pensamos que a coagulação pode reter parcialmente algumas das substancias colloidaes do plasma.

Vejamos quaes. Ao ultra-microscopio, o plasma nos apresenta uma phase dispersa cujas particulas se acham em movimento browniano mais ou menos intenso (*hemoconias*).

Pela theoria cinetica, a intensidade destes movimentos é funcção do grau de dispersão colloidal e em razão inversa do diametro das micellas.

Póde-se conhecer pelo calculo sua dispersão seu numero e volume. Sua natureza, porém, ao litigio das opiniões, não está completamente elucidada, nem o será nunca, emquanto se pretender identifi-cal-a a uma substancia unica.

A parte predominante é a que cabe ás gorduras e aos lipoides.

Todos accordam neste ponto e em seu apoio um conjuncto de factos assaz numerosos de chimica e de physiologia parece-lhes indiscutivelmente favoravel.

Ao contrario das albuminas, cujas soluções são opticamente vasias, amicronicas, as gorduras são susceptiveis de revestir a fórma colloidal dispersada, sobretudo quando, como no plasma, á custa da força protectora de hydrosoes.

O alto grau de dispersão das micellas proteicas confere-lhes o aspecto optico das soluções verdadeiras.

A excepção destes *sols* sôro-sanguineos de que as proteínas são os principaes, um grande numero de substancias livres de combinações devem constituir, sob a fórma *gel*, a apparencia ultramicroscopica das hemoconias—o glycogeneo, a cholesterina, phosphatides (lecithina, cephalina), cerebrosides (cerebron, cerasina) sulfatides (jecorina, etc.), emfim lipoides e gorduras.

Referimo-nos á normalidade, porque, em outros estados, até mesmo crystaloides, attingida a capacidade de saturação permittida pelo plasma, seu excesso irá provavelmente incorporar-se á phase solida (uratos, etc.).

Não seria para admirar-se, quando é sabido que, em soluções salinas supersaturadas, uma pequena parte do crystaloide passa á fórma colloidal.

Todas as substancias que constituem o *dispersoid* no complexo colloidal que o plasma representa pareceu-nos á reflexão poderem ser retidas parcialmente pela coagulação, mormente em certas lipemias, onde as hemoconias crescem immensamente em numero e tanto em volume que se tornam visiveis microscopicamente a pequenas ampliações.



Nestes casos, os resultados de analyses effectuadas no sôro não nos parecem exprimir o verdadeiro theor de gorduras e lipoides.

Dever-se-ia preferir o plasma, porque particulas tão volumosas poderiam em parte ser incorporadas á massa solida.

Como o estado pathologico exaggera aqui as proporções normaes, seria curioso pesquisar se o coagulo retém as gorduras, lipoides, glycogeneo, tudo que, no estado normal, representa a phase *gel* do plasma.

Alguns argumentos falam-nos em favor.

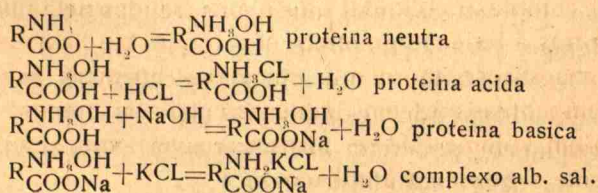
As operações effectuadas com dealbuminisação do plasma ou sôro acarretam comsigo, quantitativamente, as gorduras e lipoides, tanto que autores se baseiam nisso para separação e dosagem das combinações phosphoricas inorganicas, lipoidica e proteica do plasma, realizando as primeiras no soluto e as ultimas no coagulo obtido pelos reactivos.

Todas as precipitações se portam mais ou menos assim, ficando os lipoides retidos no residuo.

Para as albuminas, tem-se supposto, com relativa segurança, o mechanismo destas precipitações.

Não sómente pelos electrolytos, mas tambem as precipitações albuminosas do plasma pelos colloidaes, maxtique, caolim, oxydo de ferro hydratado, etc. se comportam como delipoidisantes.

A dissociação hydrolitica de uma mollecula proteica e acção de certos electrolytos se explicariam pelos seguintes schemas:



Para os lipoides, porém, não me parece que procedam taes explicações.

Sua precipitação, ao lado das proteínas soro-sanguíneas, explicar-se-ia mais satisfatoriamente pelo phenomeno da adsorpção.

Seria possível uma adsorpção parcial dos lipoides pela precipitação do fibrinogeno?

Vimos que as soluções de albumina se nos mostram homogêneas, isto é, opticamente viscosas, devido ao grão extremo de dispersão de suas partículas coloidaes, cujo diametro está além do limite da visibilidade ultramicroscópica, conferindo a estas soluções o aspecto de soluções verdadeiras.

Durante a coagulação da massa sanguínea, as plaquetas tornam-se o centro de convergencia e orientarão a construção da rede fibrinosa á custa da seriação linear dos granulos de fibrina precipitada, aprehendendo nas suas malhas, mais ou menos cerradas, todos os elementos figurados, inclusive a parte líquida.

A' medida da retracção e proporcionalmente á sua força, o sôro irá exsudando-se a pouco e pouco.

Procede-se uma como que filtração de dentro para fóra, atravez os intersticios de uma massa compacta de globulos e fibrina.

As hemoconias, pela pequenez do seu diametro, escapariam á aprehensão, filtrando-se juntamente com o sôro; acreditamos, porém, que se não encontram ahi quantitativamente.

Diminuida a retractibilidade do coagulo, a exsudação prosegue morosamente e as partículas solidas poderiam permanecer mais ou menos retidas pela filtração lenta contra tantos obstaculos.

De outro lado, as precipitações electrolytas ou coloidaes, adsorvendo taes partículas mais ou menos integralmente, poderiam encontrar uma explicação similar na coagulação fibrinogenica.

Emfim, o phenomeno da adsorpção e a filtração devem modificar o theor lipoidico, exprimindo-se no sôro por valores analyticos inferiores aos do plasma.

Mas não estão aqui os unicos argumentos; ha-os ainda de outra categoria, concernentes estes ao conjuncto de circumstancias que condicionam a coagulação sanguinea.

Numerosas concepções se têm formulado para revelar-lhe o determinismo.

Algumas ha, porém, cuja existencia autonoma se justifica mais pela introduccão do detalhe, que propriamente pela divergencia nos conceitos fundamentaes.

A. de Bordet, melhor que qualquer outra, actualisa a questão.

Ella lhe não pertence effectivamente; é antes uma conciliação do que de mais geral e positivo se encontra nas theorias que a precedem.

Para Bordet, o desencadeamento do phenomeno depende sobretudo de tres substancias fundamentaes: uma cellular, cytozima, thermostavel, encontrando-se em todas as cellulas do organismo, nos globulos brancos e plaquetas particularmente; outra humoral, thermolabil, igualmente em estado potencial, sob a forma de profermentos e, finalmente, o fibrinogeno, globulina existente no plasma.

Em condições especiaes, os profermentos plasmico e cellular a que se attribue, inclusive Bordet, a natureza lipoidica, transformando-se em substancia activa, se conjugam, catalysados pelos ions  $Ca^{++}$ , na formação de thrombina que, defronte ao fibrogeno, condição ultima, desencandeia o phenomeno.

O que dissemos resume equacionalmente quasi a theoria sem accessorios.

Em toda sua generalidade exprimil-a-iamos (Profermentos — fermentos + calcio — thrombina) + fibrinogeno = coagulação.

A relativa originalidade da theoria de Nolf, está em não se divergir tão profundamente quanto póde parecer das de Schmidt, Spiro, Howel, Moravitz e, finalmente, da de Bordet e Delange.

Encontramos aqui os mesmos tres elementos basicos communs: cellular. (cytozima) e plasmico (thrombogeno e fibrinogeno) apenas variando com as equações reaccionaes, o conceito de causa e effeito.

A equipotencialidade das cargas colloidaes do plasma mantem a fluidez sanguinea e condiciona a sua precaria estabilidade.

A coagulação corresponde a uma neutralisação reciproca dos signaes electricos com *gelisação* de uma ou mais substancias da phase *sol*.

E', sem pormenores, o estado actual da questão polarisado nestas duas theorias.

Si as citamos na sua toda generalidade, sem nos prendermos ao detalhe, foi porque as objecções que a cada passo se lhes levantam obrigar-nos-iam a prolongar demoradamente pelas suas congeneres.

A uma das suas particularidades, porém, não nos podemos furtar, porque se lhe cabe, em pequena parte, um dos motivos para o qual a nossa attenção se voltou como objectivo preliminar da these.

E' a que diz respeito á natureza lipoidica dos agentes coagulantes que, portanto, participam directamente da coagulação como causa efficiente, além, dos egualmente lipoidicos que a catalysam favoravelmente pela sua função thromboplastica.

Sobre se taes substancias sejam lipoides é ponto controverso, tanto que, actualmente, se discute muito o chimismo e individualidade das cytozymas, serozymas, thrombozymas, thrombinas, anti-thrombinas, thromboplastinas.

Mas, como quer que seja, a noção lipoides penetrou no mechanismo intimo da coagulação e figura ho-

je na maior parte das theorias, seja para recusar-lhes, seja para assegurar-lhes uma participação obrigatoria.

Aquelles, porém, que negam aos lipoides uma cooperação imprescindivel, reconhecem-lhes, no emtanto, uma funcção accessoria e constante nas condições normaes em que se procede a coagulação.

Disto ha affirmações categoricas e uma serie de factos experimentaes assaz consideravel forneceram um grande numero daquelles, entre cujas maiores preoccupações, estava a do grande enigma.

Si, portanto, aos lipoides se attribue um papel importante no desenvolvimento da coagulação, porque motivo não poderiam elles ficar parcialmente retidos no coagulo?

Si despresassemos, porém, estes argumentos relativos aos agentes coagulantes como de valor discutivel, restava-nos um, cuja importancia se sobreleva a todos—o da energia particular que o estado colloidal empresta a estas substancias.

Fal-as adquirir polaridade electrica e se precipitar pela neutralisação de suas cargas.

Pela immensa superficie da phase dispersada, elles se mostram energeticos adsorventes e podem ser ao mesmo tempo energeticamente adsorvidos.

Exemplifiquemos duplamente—a adsorção de electrolytos pelos colloidaes (proteinas — saes) e a de colloides (materias corantes) por outros colloides (colorações bacteriologicas, etc.), fermentos pelos lipoides.

As dimenções das particulas *gel* do plasma oscillam entre 1  $\mu$  a 0,01  $\mu$ , este ultimo como limite da visibilidade ultramicroscopica.

Pela tabella de Wo. Ostwald, 1  $\text{cm}^3$  de taes particulas desdobrariam, totalizando superficies, uma area correspondente, respectivamente a 60  $\text{mq.}$  e 600  $\text{mq.}$

O alto gráo de divisão multiplica os contactos e augmenta em cada desdobramento a capacidade reaccional.

Resumindo:—os lipoides do sangue podem ser retidos pela coagulação, seja mecanicamente, seja pela adsorção.

Encontra-se no sangue uma grande variedade de fermentos.

Eventualmente, outros poderão se achar ahi, em virtude de modificação de regimen ou introduccão paraenteral de substancias estranhas ao organismo.

Os fermentos digestivos não se lhes comparam pela sua menor especificidade.

Fermentos de demolição, elles não promovem a synthese, porque esta fica a cargo de trabalho cellular mais intimo que, ou guarda de reserva os materiaes energeticos, ou plasma novos similarmemente, isto é, integrando particulas alimentares communs em edificios particularmente especificos.

E nisto a cellula de organismo superior se comporta á semelhança de um nono cellular, apenas differindo d'elle pela sua maior especialisação.

Por isso que, vivendo em meio interior mais fixo, chimica e physico-chimicamente, que o externo em que aquelle se nutre, concorre para que elle possua, ao lado de fermentos estrictamente especificos, outros mais geraes que lhe garantam facilmente a alimentação.

Abderhalden verificou que protistas eram capazes de agir sobre substancias artificiaes de laboratorio, impossivel a qualquer outro elemento cellular, funcções estas que se comparam ás que se realizam no tubo gastro-intestinal dos organismos superiores.

Cada cellula elabora para as suas proprias necessidades e lucta, á custa de fermentos, para manter a sua especificidade chimica.

O sangue contem uns e outros.

Interessam-nos particularmente os que se destinam a funcções mais geraes—glycolyticos, lipolyticos, proteolyticos.

*Fermento glycolytico.* A glycolyse é, na hora actual, um dos problemas mais complexos.

Claude Bernard verificou (experiencia das 5 capsulas) que o sangue perdia, algum tempo depois de extrahido, todo o seu assucar.

Havia diminuição ou desaparecimento da propriedade reductora.

Desde então, os pesquisadores concentraram sua actividade em torno do assumpto.

Innumeras interpretações se lhe têm dado.

Haveria uma combinação de glycose com as proteinas, gorduras e lipoides, na qual ella se dissimularia, passando á existencia virtual.

Haveria uma fermentação alcoolica e os seus productos teriam sido encontrados no sôro por diversos pesquisadores.

Haveria uma transformação em acido lactico e  $\text{CO}_2$  e, como consequencia, estes seriam augmentados no sangue.

Haveria uma oxydação do annel  $\text{CH}_2\text{OH}$  para  $\text{COOH}$  com formação de acido glycuronico que se conjugaria pelo radical  $\text{COH}$  a outras substancias.

Haveria uma transformação em uréa em presença de ions  $\text{NH}_4$ .

Não para ahi o numero de hypotheses.

Ha bastantes factos que pleiteiam em favor de qualquer destas como de outras mais.

Mas o que está satisfactoriamente positivado é que a glycolyse começa com a retirada do sangue e avança com o tempo.

O sôro obtido algum tempo depois não exprimiria mais o theor do plasma em assucar.

A temperatura do laboratorio favorece-a, o tempo, e o contacto com as cellulas sanguineas ajudam-n'a igualmente.

E' verdade que o assucar virtual se desprende de combinações labéis e compensa mais ou menos o assucar livre, mas se destroe finalmente.

Temos verificado com dosagens microquímicas, realizadas em 1 cm<sup>3</sup> de plasma e soro, a enorme diferença nos resultados, a ponto de muitas vezes se não encontrar glycose no ultimo.

*Lipase* — O sangue contem lipases que continuam no meio interior a acção iniciada no intestino.

Suppõe-se que 20 a 30 % das gorduras absorvidas atravessam a parede intestinal sem previa saponificação e, neste ponto de vista, ellas se comportam como se penetrassem paraenteralmente.

Estas e outras vão encontrar no plasma o fermento que ás desdobrará.

A lipolyse é mais activa depois da ingestão de grandes quantidades de gorduras, que em jejum.

Porem, si este se prolonga extraphysiologicamente, a lipase, e não somente ella como outros fermentos, augmentam igualmente, porque o exige a mobilização de reservas que irão satisfazer ás necessidades energeticas sobre todas.

Seu theor variavel pode ser demonstrado *in vitro* com mono e triglycerides por varios meios. A dissociação hydrolytica em glicerina e acidos graxos livres permittiu a Hirsch o emprego do methodo electrometrico. O regimen modifica a actividade dos fermentos plasmaticos, de glycolyse e lipolyse principalmente.

A introduccão artificial, como a de origem alimentar, estimula a ambos.

O theor em proteínas circulantes no plasma seria o mesmo para uns, porem não para todos os bio-químicos.



Haveria também phenomenos proteolyticos de acção mais lenta, porém, que para aquelles, (hydratos de carbono e gorduras).

A coagulação realiza todas as más condições para um analysta.

Resumimol-as brevemente:

a) Modifica a reacção inicial—a concentração ph baixa.

A reacção alcalina se vae neutralizando pela acidez crescente.

A mudança de reacção é indice de alterações chemicas modificadoras dos constituintes.

b) Ha casos em que, por dyscrasia, a retracção do coagulo não se faz normalmente e o sôro exsudado é insufficiente para a analyse.

A maceração do coagulo que a remediaria introduz com as destruições globulares substancias que lhe não pertencem propriamente.

c) A quantidade de plasma é sempre superior á do sôro para uma mesma quantidade de sangue.

d) A obtenção do plasma é rapida e as analyses podem iniciar-se immediatamente, emquanto a do sôro é de uma morosidade indeterminada, variavel de individuo para individuo, além de outras concurrencias, temperatura, etc. etc.

e) Deixa de haver uma provavel adsorpção de substancias pelo coagulo.

f) Supprimido o tempo que medeia entre a coagulação do sangue e exsudação do sôro entre estas e as analyses, raramente menos de 12 horas, ipso facto, se eliminam, com as acções inevitaveis de fermentos, as accidentalmente microbianas.

g) O plasma se pode obter de mil modos e francamente não prevejo em que condições seria incompativel a incoagulabilidade artificial com o fim a que elle se destinasse.

h) Quando a analyse não se possa realizar immediatamente, muitos dos anti-coagulantes se comportariam como antilyticos.

Temos realizado dosagens de lipoides no plasma e no sôro de um mesmo animal, recolhendo ao mesmo tempo o sangue em dois vasos completamente seccos, contendo um delles o anti-coagulante finamente pulverisado—NaF ou (COOK)<sup>3</sup>.

Obtivemos o plasma por centrifugação e o sôro pela coagulação espontanea.

Os lipoides foram extrahidos pelo processo adeante indicado para a sua microdosagem.

Em um centrifugo electrico regular, obtivemos mais da metade do volume do sangue em plasma, que é logo pipetado e incorporado ao sulfato de sodio anhydro, para ser extrahido contemporaneamente ao sôro correspondente.

Raramente, pudemos obter a quantidade desejada de sôro, 25 cms.<sup>3</sup> sobre 80 de sangue, em condições de pureza semelhantes ás do plasma, pelo que se tornava necessaria uma centrifugação.

Em uma dosagem effectuada em um sôro para cuja obtenção da quantidade precisa, foi necessaria uma maceração do coagulo, obtivemos resultados superiores aos do plasma.

Todo sôro foi colhido depois de decorridas mais ou menos 12 horas após a coagulação.

Aqui estão enquadados os resultados de dosagens das 5 que fizemos.

As outras duas provas, apesar de nos serem favoraveis, deixam de ser relatadas, por motivo de technica suspeita.

Mas estas tres dosagens, pelo rigor que as presidiu, temos a certeza de que valem por uma dezena.

	Plasma	Sôro	Diferença
1.....	4,168	3,98	0,188
2.....	2,79	2,613	0,177
3.....	3,88	3,76	0,12

Tudo isto demonstra que o sôro, nas condições em que o obtivemos, encerra menos quantidade de gorduras ou lipoides que o plasma.

Porém não diz que o coagulo as tivesse retido.

As nossas experiencias deveriam seguir um outro rumo que não nos foi possível pela complexidade com que o problema se nos impunha.

No caso do plasma, subtrahimol-o immediatamente á acção lytica dos fermentos pela addição de NaF e seccagem ao  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , enquanto o sôro se encontrava em condições oppostas de conservação.

Tudo podia ter concorrido—adsorpção pelo coagulo, acção lipolytica, etc. Como dissocial-os era toda a nossa difficuldade.

Os processos quantitativos que medem a acção de fermentos lipolyticos, sobretudo, requerem um estudo demorado que não nos permite actualmente penetrar-os.

De qualquer forma, a nossa intenção era demonstrar que o sôro não exprime o theor exacto do plasma em um certo numero de substancias.

Acreditamos, firmemente hoje, que é necessario realizar a dosagem dos lipoides e gorduras no plasma, em vez do que se faz, ordinaria e exclusivamente, no sôro.

A lipolyse deve ser relativamente lenta para que tenha passado despercebida a maioria dos analysts.

Ha no sangue uma lecithase que decomporia a lecithina em acidos glicerophosphorico, graxos e no radical, oxyethilenotrimethylammonio.

Uma esteráse que teria acção analoga sobre os compostos da cholesterina, particularmente augmentados ambos, segundo Justschenko, nos casos de molestias mentaes.

Dos resultados de dosagens de um certo numero de crystaloides effectuadas no sôro e no plasma não nos foi possivel colher documentação segura que nos permittisse juizo definitivo, por isso que muitos dos processos que experimentamos carecem de rigor tecnico desejavel.

Não podiamos tão pouco dosar todos os crystaloides do plasma e do sôro, senão os principaes delles.

Reconhecemos tambem que esta demonstração, em parte, é de ordem physico-chimica e, posto que a tivessesmos planeado, sua execução seria actualmente para nós não sem grandes difficuldades.

Methodos analyticos, recentemente systematisados e introduzidos em chimica biologica, irão constituir, d'ora avante, o rumo a todas as iniciativas dos biochimicos que se não contentam com a simples observação de reacções, mas se empenham desejosos de medil-as e exprimil-as equacionalmente. Refiro-me á microchimica.

Sob esta denominação, têm-se comprehendido entre nós exclusivamente os processos physicos da chimica qualitativa que se limitam ao estudo das reacções coradas, precipitações e dissoluções sobre a platina do microscopio.

Seu conceito dilatou-se enormemente e, podè-se dizer sem receio, é uma nova chimica que surgiu e se individualisa, dia a dia mais, pela originalidade de seus processos de medida, pelas suas especialissimas condições operatorias.

Sua apparição dependeu sobretudo do aperfeiçoamento de aparelhos de physica, aos quaes pelo seu progresso ella se acha indissolúvelmente ligada.

Construíram-se micromodelos.

Balanças que permittissem a pesada de quantidades inferiores ás que podem revelar as de precisão, usuaes em nossos laboratorios, alcançando raramente alem do 0,0001 gr.

Sufficiente para os processos ordinarios de dosagens, ellas têm aqui um numero limitado de applicações.

A lipolyse deve ser relativamente lenta para que tenha passado desapercibida a maioria dos analytas.

Ha no sangue uma lecithase que decomporia a lecithina em acidos glicerophosphorico, graxos e no radical, oxyethilenotrimethylammonio.

Uma esteráse que teria acção analoga sobre os compostos da cholesterina, particularmente augmentados ambos, segundo Justschenko, nos casos de molestias mentaes.

Dos resultados de dosagens de um certo numero de crystaloides effectuadas no sôro e no plasma não nos foi possivel colher documentação segura que nos permittisse juizo definitivo, por isso que muitos dos processos que experimentamos carecem de rigor tecnico desejavel.

Não podiamos tão pouco dosar todos os crystaloides do plasma e do sôro, senão os principaes delles.

Reconhecemos tambem que esta demonstração, em parte, é de ordem physico-chimica e, posto que a tivessesmos planeado, sua execução seria actualmente para nós não sem grandes difficuldades.

Methodos analyticos, recentemente systematisados e introduzidos em chimica biologica, irão constituir, d'ora avante, o rumo a todas as iniciativas dos biochimicos que se não contentam com a simples observação de reacções, mas se empenham desejosos de medir-as e exprimir-as equacionalmente. Refiro-me á microchimica.

Sob esta denominação, têm-se comprehendido entre nós exclusivamente os processos physicos da chimica qualitativa que se limitam ao estudo das reacções coradas, precipitações e dissoluções sobre a platina do microscopio.

Seu conceito dilatou-se enormemente e, pôde-se dizer sem receio, é uma nova chimica que surgiu e se individualisa, dia a dia mais, pela originalidade de seus processos de medida, pelas suas especialissimas condições operatorias.

Sua aparição dependeu sobretudo do aperfeiçoamento de apparatus de physica, aos quaes pelo seu progresso ella se acha indissoluvelmente ligada.

Construíram-se micromodelos.

Balanças que permittissem a pesada de quantidades inferiores ás que podem revelar as de precisão, usuaes em nossos laboratorios, alcançando raramente alem do 0,0001 gr.

Sufficiente para os processos ordinarios de dosagens, ellas têm aqui um numero limitado de applicações.

Encontram-se micro-balanças do centesimo ao milionesimo do miligrammo, estas de uma exquêsita sensibilidade.

Para as exigencias de laboratorio, recommendam os autores as microbalanças Kulhmann e Nernst, respectivamente ao millesimo (0,001) e ao decimo millesimo (0,0001) do milligrammo.

A carga maxima que supportam está na razão approximadamente inversa da sua sensibilidade.

E não somente balanças, mas todos os apparatus de physico-chimica, vêm soffrendo profundas modificações para que se os adaptem a novas condições operatorias.

Valendo-se de toda sorte de aquisições, crearam-se novos e rehabilitaram-se antigos methods, aperfeçoando-os.

Todos os processos analyticos da chimica tem os seus correspondentes em microchimica.

Onde porém acaba uma, onde começa outra não se pode precisar sufficientemente.

Tanto que, sob a denominação «Halbmikromethodik», os allemães reservam logar para os intermediarios, aquelles que abrangem o limite inferior e superior de uma e outra, respectivamente.

Qual o limite a que a microchimica pode attingir não é dado conhecer.

Tudo depende do gráo de aperfeçoamento dos seus apparatus de medida e da sensibilidade das suas reacções.

Cada dia se descobrem novas e introduzem-se-lhes modificações, aguçando-lhes a sensibilidade ao imprevisto.

Sua tendencia é alcançar praticamente o limite theorico maximo, isto é, revelar pariculas comparaveis ao atomo.



As reacções espectroscópicas permitem-nos apreciar quantidade correspondentes ao billionésimo do milligrammo de H, egualmente para o He se tem observado a mesma sensibilidade.

Mas não basta que o processo se mostre qualitativo, é necessario tornal-o quantitativo até onde permittirem os meios praticos de avaliação.

Para manipular quantitativamente porções millesimas de substancias, um rigor technico de que se não preocupam geralmente os macroanalystas pode parecer exaggerado, mas se faz absolutamente indispensavel.

Por isso, invariavelmente, todas as nossas dosagens são acompanhadas de prova em branco, precedidas de longas pesquisas, com o fim de afastar dos processos quaesquer causas de erro que venham somar-se ás que lhe são inalienaveis.

Todos as têm mais ou menos.

Aqui, porém, os erros se multiplicam e os resultados que se obtêm, confrontados com os macroquímicos, inutilisam-os-iam definitivamente.

Seu aparelhamento se compõe mais ou menos do mesmo de que se utiliza a macroquímica, apenas com modificações que lhe confirmam maior sensibilidade: — microbalanças, micropolarímetros, micronephelômetros, microcolorímetros, micropipetas e microburetas, divididas ao quinquagesimo e ao centesimo do  $\text{cm}^3$ , microcadinhos, etc.

As soluções se titulam geralmente ao  $\frac{1}{50}$   $\frac{1}{100}$  e  $\frac{1}{1.000}$ .

A quantidade de material, de accordo com o processo de dosagem, varia de alguns milligrammos a algumas poucas grammas ou centímetros cubicos.

Os methodos microquímicos, victoriosos com os esforços de Pregl, Bang, Emich, Kleinemann e tantos

outros, abriram á physiologia normal como á pathologia experimental novos e amplos horizontes.

A possibilidade de se executar com umas poucas grammas de material aquillo que, em outras occasiões, mal bastavam dezenas, permittiu ampliar o numero de determinações quantitativas a repetidas e largas experimentações.

O atraso com que recebemos certas questões de palpitante actualidade, põe obstaculos, não raro invenciveis, a toda tentativa para fugir á rotina, sobretudo no que respeita á technica.

O desejo de lidar com taes methodos deixou-nos a dolorosa impressão da carencia do nosso mercado scientifico.

Dos apparatus de que nos servimos neste trabalho merece uma menção especial o micronephelometro.

Ha diversos nephelometros; o de que nos utilizamos consiste em uma adaptação do microcolorimetro Dubosc, sob indicação de Sig. Fraenkel. (1)

Como toda descripção se refere ao grande colorimetro, tivemos que adaptal-a ao pequeno modelo com algumas modificações que aconselhamos.

O colorimetro Dubosc é bastante conhecido para que nos preocupemos com a sua descripção.

A simples vista do cliché n. 1 dará uma perfeita comprehensão do seu funcionamento.

A sua facil desmontabilidade permite uma rapida adaptação em nephelometro.

Retiram-se os tubos fixos immersores e cubas moveis, substituindo-se os primeiros por tubos nephelometricos e as ultimas por aneis metallicos que se assentam sobre o suporte das cubas.

(1) Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden fig 53 pag 120-1922.

Os tubos nephelometricos que devem conter a substancia a dosar estão fixos e em uma rigorosa verticalidade, obtida substituindo-se o espelho por um pedaço de madeira duplamente perfurada, onde se os collocam.

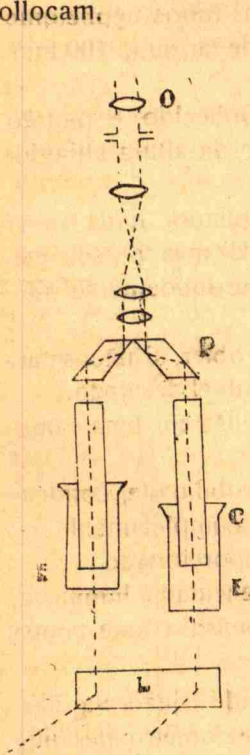


Fig. 1 — Corte longitudinal do microcolorimetro Dubosc, mostrando o seu funcionamento. O, ocular; P, prismas; C, cubos E e E<sub>1</sub>, espessuras; L, espelho

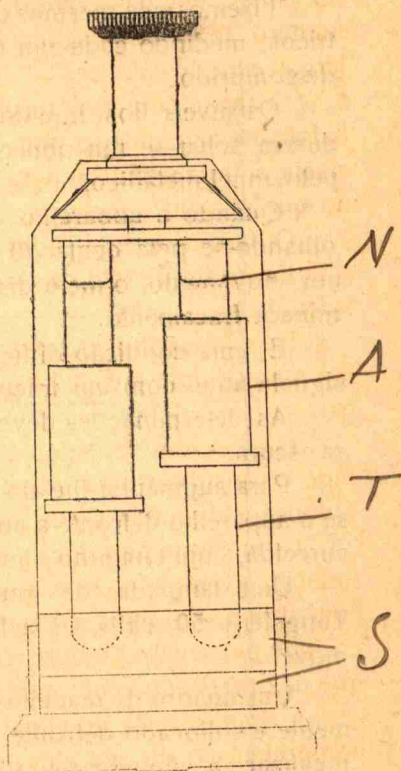


Fig 2— Micronephelometro : T, tubos nephelometricos; N, nivel do liquido nos 2 tubos; A, aneis metallicos; S, supports de madeira

Cada tubo atravessa o anel metallico correspondente e se introduz nos respectivos orificios inferiores e superiores, o que se consegue pela interposição de uma lamina de madeira na base do aparelho, immediatamente abaixo da em que se assentam os tubos.

Como não se os encontram, adaptaveis a cada aparelho e nas condições exigidas, póde-se fazel-os de um bom vidro, completamente limpido e de diametro rigorosamente igual.

Fizemos nós mesmos os nossos tubos nephelometricos, medindo cada um 6 mm. de largura, 100 mm. de comprido.

Os niveis dos liquidos, desconhecido e padrão, devem achar-se um pouco abaixo da altura attingida pelo anel metallico.

Quando o aparelho está regulado, nada se vê olhando-se pela ocular (0 da escala) mas, ao seu menor movimento, o meio disco correspondente se illuminará fracamente.

E' uma condição difficil de se obter, si não se assignala antes com um traço leve o nivel desejado.

As determinações devem ser feitas em uma camera escura.

Para augmentar-lhe ainda a sensibilidade, collocase o aparelho defronte a uma caixa completamente escura, cujo tamanho lhe seja proporcionado.

Uma lampada de grande intensidade luminosa, Tungsteno 50 watts, se acha suspensa a uma tampa movel.

Um quadro de madeira perfurado quadrangularmente e collocado defronte ao nephelometro permite focalizar a illuminação sobre os tubos, ficando em sombra as suas porções superiores e inferiores.

Deve-se manter constante a distancia da fonte luminosa.

Para um nephelometro da altura de 190 mm. construimos uma caixa com 35 cms. de comprido por 15 de altura e 25 de largo.

Uma cortina de panno preto, collocada por detraz do aparelho, veda qualquer illuminação posterior.

Os clichés mostram, o 1.º, o corte longitudinal do colorimetro Dubosc, o 2.º, a adaptação ao nephelometro,

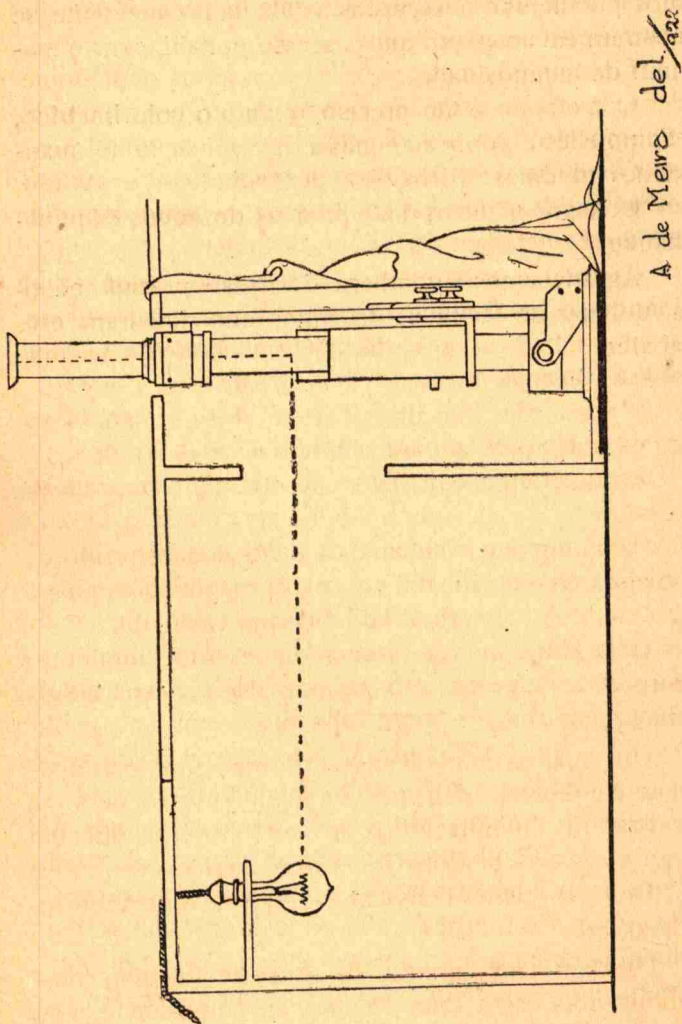


Fig. 3—Micro-nephelometro e camara escura, em funcionamento  
tro, e o 3.º o conjunto, caixa e aparelho, prompto para  
o funcionamento.

O principio do methodo é o da polarisação de Tyndall, isto é, suspensões colloidaes, atravessadas por raios parallellos e observadas a 90° da luz incidente, se mostram em um plano que passasse por ahi, com o maximo de luminosidade.

O methodo é tão preciso, quanto o colorimetrico, e como elles e applica apenas á determinação de quantidades minimas. (Erro,  $\pm 1$  a 2 %).

Utilisar-nos-emos delle para as dosagens de phosphatides.

Agradecemos a gentileza do nosso prezado collega Aldemar de Meira os desenhos que illustram este trabalho.

A denominação *lipoides* abrange substancias de natureza chimica muito diversas, como sempre acontece, quando não se conhecem ainda satisfactoriamente detalhes de constituição mollecular para a classificação em logar competente.

Factos desta ordem não se contam como excepções, mesmo no terreno da chimica.

Ha-os semelhantes em qualquer sciencia que se considere.

Justifica aquella denominação a analogia com as gorduras por algumas das suas propriedades physicas communs, como a da solubilidade.

Reconhece-se immediatamente a que perigosa amplitude pode alcançar uma definição que se baseasse unicamente nesta particularidade.

Alguns autores a têm dado, sem se lembrarem de que substancias sem sombra de analogia com os lipoides, possuem como elles a propriedade de se dissolver nos solventes das gorduras.

De outro lado, definidos assim estreitamente, teriamos que afastar do grupo um grande numero de substancias, apezar de genuinamente lipoides.

A exemplo, podemos citar a crinosina ( $C_{38}H_{70}NO_5$ ) insolvel no alcool e no ether a frio; a sphynomyelina  $C_{119}H_{272}N_5PO_{30}$  e a lysocithina, igualmente insolvel no alcool e no ether, esta ultima completamente soluvel em agua.

A Sahidina  $C_{80}H_{107}N_3P_2O_{12}$ , insolvel no ether e difficilmente soluvel no alcool a quente.

A jecorina  $C_{105}H_{195}N_6P_3SO_{46}Na_7$  é soluvel em agua e se precipita pelo ether anhydro.

De outro lado, enquadram-se na definição corpos chimicamente definidos em outras categorias como— alcaloides, até mesmo saes mineraes, etc.

Ha para mais de uma dezena de lipoides chimicamente identificados; porem a variabilidade dos seus edificios molleculares, condicionando-lhes propriedades physicas e chemicas particulares, complica singularmente toda tentativa de classificação racional.

Ha mais um motivo intrinseco de difficuldades para uma systematica, que propriamente uma questão de palavras como certos autores têm comprehendido, propondo em substituição ao termo lipoide — lipina (Well) adipoide (Iscovesco).

E' um problema por muito tempo a resolver.

Consequencia de uma necessidade transitoria, a designação rigorosamente impropria não tem o caracter de permanencia pela heterogeneidade morphologica e, consequentemente, functional dos corpos que ella encerra.

.....  
.....  
.....  
.....

Fazia parte da nossa these um estudo mais ou menos detalhado de um grande numero de lipoides, muitos dos quaes preparamos cuidadosamente.

As condições de espaço que nos foram concedidas para esta publicação não permittiram nos referissemos a elles, mesmo ligeiramente.

Digamos, porém, alguma cousa sobre as sterinas, por isso que propomos para ellas um novo processo de dosagem que se acha no fim do trabalho.



Contam-se por dezenas os chimicos que tomaram a si a tarefa de esclarecer a estructura e funcção das sterinas.

Do seu estudo analytico, se têm originado numerosos productos ainda pendentos de maiores esclarecimentos, por isso que a muitos delles se é forçado a admittir como estados intermediarios; e, emquanto não se conhecer, com sufficiente precisão analytica, as partes que se integram na mollecula, todo trabalho de synthese resultará esteril.

Não se conseguiu synthetisar uma qualquer das cholesterinas.

A analyse elemental deu formulas diferentes quanto ao seu theor em hydrogeneo:  $C_{27}H_{44}O$  (Berthelot)  $C_{27}H_{46}O$ —Windaus, esta ultima hoje mais em favor. Composto ternario, sua funcção se acha condicionada pela ligação do atomo de oxygeneo.

A propriedade da cholesterina de formar esterres poz em evidencia o radical oxydrilico OH e a sua oxydção em cholestanona permittio classificá-la entre os alcooes secundarios.

Por ahi se vê que a denominação cholesterina é impropria.

Chamal-a-iamos melhor *cholesterol*.

Determinada a funcção atomo oxygenio, restava a sua localisação, bem como a da dupla ligação que faz da cholesterina um alcool não saturado.

Ella addiciona o hydrogeneo e os halogeneos.

São dois caracteres que lhe têm valido como indice de ligações quantitativas.

Pela funcção alcool, a cholesterina combina-se a acidos mineraes e organicos.

Conhece-se um grande numero em estado de pureza.

Sob a forma de oleato, palmitato, stearato e outras combinações graxas, encontra-se no organismo,

compreendida na denominação *cholesterina combinada*, dependendo da especie animal considerada, a natureza do composto.

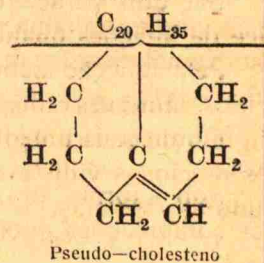
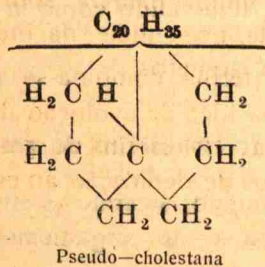
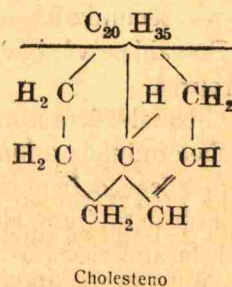
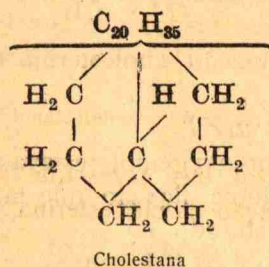
O oleato de cholesterina predomina para a especie humana.

Algumas destas combinações foram em tempo utilizadas para sua determinação quantitativa e outras ha hoje que servem ao diagnostico differencial das sterinas.

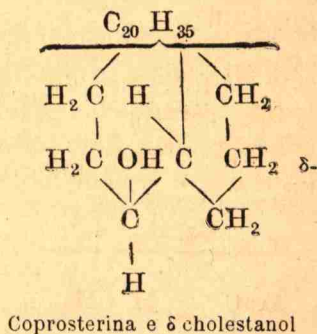
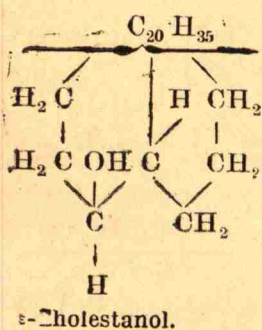
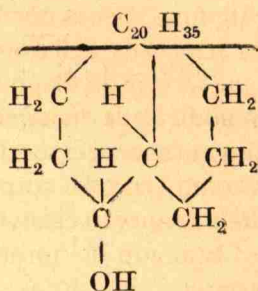
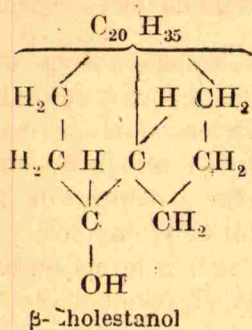
A adição de halogeneos,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$ , principalmente, deu origem a processos de dosagem, a maneira de indices como para os corpos graxos não saturados.

Pela redução catalytica, ella se transforma em um lalcool saturado de formula  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$ , denominado  $\beta$ -cholesterina que não se deve confundir com a coprosterina.

A cholesterina deriva de um hydrocarbureto da série terpenica—cholestana, diverso do da coprosterina—pseudo-cholestana ou coprostana, aos quaes correspondem dois outros de serie immediata, o cholesteno e o pseudocholesteno.



A redução dos steróes isómeros para seus hydrocarburetos é um dos caracteres de classificação adoptado por Windaus.

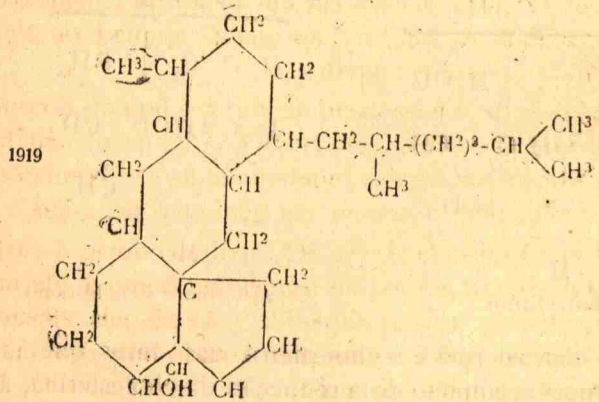
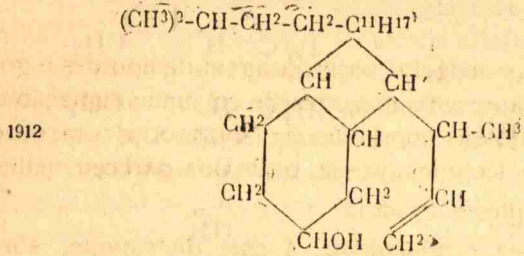
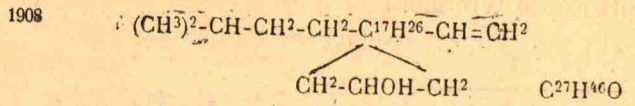


A coprosterina é o cholesterol das fezes que se forma provavelmente pela redução da cholesterina, á custa de bacterias intestinaes.

Windaus, a quem se deve a ultima palavra sobre o assumpto, trabalha, actualmente, no sentido da melhor caracterisação destes quatro isómeros.

As formulas abaixo dão uma idéa da evolução de alguns de seus trabalhos sobre a cholesterina durante os preciosos vinte e muitos annos de dedicação ao estudo das sterinas.

CHOLESTEROL (WINDAUS) (1)



Os phytosteroes são tão numerosos quanto os zoo-steroes.

(1) Boll. de la Soc. Chim. France—1922

O processo geral para dosagem de lipoides e gorduras que apresentamos, consiste em uma adaptação de outros ás nossas condições de laboratorio, com introduções de technica nossa, onde nos pareceu melhor.

E' simples e exacto.

Pipeta-se, precisamente, 1 cm<sup>3</sup> de sangue, sôro ou de preferencia plasma em um balão de Erlenmeyer da capacidade de 50 cm<sup>3</sup>, ao qual se ajunta 1 ou 2 gr. de sulfato de sodio anhydro.

Depois de um contacto de horas, o liquido é completamente absorvido pelo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e assim o material se conserva por tempo indeterminado, em condições de permittir uma dosagem em qualquer occasião.

Cada molecula de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, hydratando-se á custa de 10 d'agua, a acção de fermentos, como a de microorganismos, estaria impedida, não só pela elevada concentração salina, como pelo estado anhydro mais ou menos completo do meio.

E' incomparavelmente mais vantajoso empregarem-se os processos de seccagem do material, á custa de saes CaSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, que submettel-o directamente á acção do calor ou solventes como o fazem certos autores, sobretudo francezes (Mayer e Schaeffer, Grimbert e Laudat).

Fraenkel recommenda o emprego do Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> preferentemente ao do Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para as grandes extracções, cada molecula de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> absorvendo 12 de H<sub>2</sub>O.

O risco de contaminarmos o nosso material de phosphato fez com que o não empregassemos, porque minimas quantidades extrahidas não seriam sem influencia na determinação dos phosphatides.

Construimos um micro-extractor, á feição dos modelos ordinarios, o qual nos permite a extracção de volumes inferiores a 5 cm<sup>3</sup>.

Trabalhando actualmente com quantidades inferiores ás que, ao começo dos nossos estudos, exigimos, passamos a nos servir de um outro processo mais simples, tão rigoroso quanto aquelle, com economia de tempo.

Consiste em adaptar ao balão que contém o material um tubo de vidro de 0,mm3 a 0,mm5 de largo e 0,mm50 de comprido, atravessando uma rolha de cortiça, á maneira do dispositivo empregado para determinação do indice de saponificação.

Põem-se-lhe dentro 5 cm<sup>3</sup> de alcool absoluto e leva-se ao banho-maria em ebulição, durante 5 minutos.

O alcool a quente dissolve todos os lipoides e gorduras e se separa limpido por um pequeno repouso do balão fóra do calor.

Decanta-se em uma capsula a camada liquida, evitando sejam acarretadas as particulas solidas.

Repete-se, 3 a 4 vezes, a mesma operação. Dentro de 20 a 30 minutos, está realizada a extracção.

Temo-nos assegurado de que por este processo se extraem completamente todas as gorduras e lipoides.

O alcool da extracção é passado em filtro de Allihn adaptado á trompa e recolhido em outro balão de 50 cm<sup>3</sup>.

Como elle póde acarretar outras substancias diversas dos lipoides, nós o evaporamos completamente em banho-maria, retomamos o residuo secco pelo

$\text{CHCl}_3$  destilado e anhydro, passando-o novamente em um filtro de Allihn, recolhendo-o em um pequeno balão de 30  $\text{cm}^3$  convenientemente tarado.

Evapora-se o  $\text{CHCl}_3$  ao banho-maria e termina-se o dessecamento na estufa, durante 1/2 hora, á temperatura de 60 a 70°.

Pesa-se até se obterem resultados aproximadamente constantes.

Faz-se depois o calculo para % ou ‰.

A quantidade obtida representa o teor em lipoides totaes e gorduras.

Em tão pequena quantidade de material, não saberíamos praticar os indices sem que commettessemos erros gravissimos, tão pouco elles seriam applicaveis aqui e todos os autores que os incluem systematicamente operam com um minimo de 20  $\text{cm}^3$  de sôro.

Serviriam mais para a determinação quantitativa de acidos graxos totaes, que para qualquer outra substancia.

O indice de iodo, como alguns autores têm proposto para a dosagem da lecithina, forneceria resultados elevadissimos, devido á presença da cholesterina e acidos graxos não saturados em combinações não lecithinicas.

Não vejo conveniencia no conhecimento dos indices, nada que compense sacrificio de tão grande quantidade de material.

Dissolve-se o residuo de extracção que servio para a determinação dos lipoides e gorduras totaes em alcool absoluto, de modo a se obterem exactamente 8  $\text{cm}^3$ , o que se consegue por lavagens do balão com pequenas porções de alcool mais ou menos quente, passando-as para um tubo graduado.

Deixa-se esfriar, completa-se com alcool até a marca e divide-se o todo em quatro partes.

Para determinação da cholesterina e lecithina, basta dividil-o em duas porções, operando-se em cada uma a respectiva dosagem; mas, quando se deseja conhecer o teor da cholesterina livre e o da combinada, fazem-se necessarias duas dosagens, uma depois de previa saponificação.

Para a cholesterina livre, tomam-se duas partes, isto é, 4 cm<sup>3</sup> procedendo-se á dosagem, seja gravimetrica, seja colorimetrica, seja volumetricamente.

Como a quantidade de cholesterina livre é sempre inferior á da combinada, torna-se necessaria uma maior quantidade de material.

*Cholesterina total* (cholesterina livre + cholesterina combinada).

Para a determinação da cholesterina total, pipetam-se 2 cm<sup>3</sup> (0,25 de plasma) põe-se em um erlemeyer de 50, acrescentando-se 10 cm<sup>3</sup> de uma solução alcoolica de hydrato de potassio a 10 %.

Dapois de 1/2 hora de banho maria a ebulição, os esteres da cholesterina se acham saponificados. Evapora-se a secco, deixa-se esfriar e lava-se quantitativamente ao ether.

Si o ether não está anhydro, acarretará hydrato de potassio, o que exigirá uma pequena lavagem a agua e dessecação por um deshydratante (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), etc.

Destilla-se o ether; o residuo da destillação é constituido pelo insaponificavel—a cholesterina.

Eliminam-se em banho maria todos os vapores de ether. Retoma-se o residuo pelo alcool absoluto quantitativamente para 10 cm<sup>3</sup>.

Com esta solução alcoolica pode-se proceder directamente a dosagem gravimetrica ou volumetrica. Para a colometrica, porem, retomariamos o residuo da destillação pelo CHCl<sub>3</sub> em vez do alcool.

Falaremos, daqui a pouco, sobre as dosagens da cholesterina.



*Dosagem de phosphatides.*

Evaporam-se 2 cm<sup>3</sup> da solução alcoolica, 0,25 de plasma em um balão de 50 cm<sup>3</sup>, até que todo o alcool tenha desaparecido, por isso que pequenas quantidades bastariam para impedir a oxydação completa dos phosphatides.

Procede-se então a sua decomposição oxydando-os para H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, á custa da mistura de Neumann que se obtem adicionando, volume a volume, HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados.

Põem-se no balão 2 cm<sup>3</sup> da mistura; deixa-se um pouco em repouso e procede-se a um aquecimento lento ao principio. Desenvolvem-se abundantes fumaças de NO que desaparecem completamente, deixando limpido o liquido. Continua-se o aquecimento até quasi a ebulição por mais cinco minutos.

Depois de resfriado, lava-se quantitativamente o balão com agua destillada, transvasando-a para um outro balão graduado de 50 cm<sup>3</sup>.

Completa-se até a marca.

Preparação da solução padrão. Kleinemann.

Tomam-se 302,9 milligrammos de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 12 H<sub>2</sub>O dissolvendo-os em 1.000 cm<sup>3</sup> de agua destillada.

Para o uso, dilue-se 10 vezes a solução.

Empregam-se de cada vez 5 cm<sup>3</sup> desta solução que contem 0,00003 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Em vez Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O, preferimos o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, calculando para titulo igual.

Outros preferem a aconselhada por Bloor. Pesam-se 0,6942 gr. de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 gr. de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e dissolvem-se em 1.000 cm<sup>3</sup> de agua destillada.

Para as dosagens nephelometricas, dilue-se 10 vezes a solução; 1 cm<sup>3</sup> desta ultima correspondendo a 0,00005 de H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>.

As outras soluções necessarias são:

Solução alcoolica de phenolphthaleina, como indicador.

Solução de NaOH a 20 %.

» » HNO<sub>3</sub> diluido 1:2.

Reactivo strychnomolybdico.

Ha varias formulas para a preparação deste reactivo. Adoptamos a de Kleinemann que tem sobre as demais a vantagem de não exigir a sua conservação em dois frascos separados (I sol. molybdica, II sol. strychnica).

Põem-se 30,4 gr. de MoO<sub>3</sub> isento de ammonio, 9,6 de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydro em um balão com 200cm<sup>3</sup> de agua destillada e leva-se á ebulição até que o acido molybdico se dissolva inteiramente.

Filtra-se a solução e ainda quente ajuntam-se 160 cm<sup>3</sup> de HCl conc. (p. e. 1,19).

Em vaso separado, dissolve-se 1,6 de sulfato de strychnina puro em 100 cm<sup>3</sup> d'agua destillada a 90°.

Depois de frias, ambas as soluções são reunidas em balão graduado de 1.000 cm<sup>3</sup>, completando-se o volume com agua destillada.

Guarda-se a solução em frasco escuro.

Para se proceder a dosagem nephelometrica, pipetam-se 20 cm<sup>3</sup> da solução de theor desconhecido (0,1 de plasma) e põe-se em balão graduado de 50 cm<sup>3</sup>. Em outro balão de igual capacidade põe-se 1cm<sup>3</sup> da solução padrão.

Como uma das soluções está acida, convem neutralizal-a para que fiquem ambas em egualdade de condições.

Põe-se 1 a 2 gottas de phenolphthaleina e, gotta a gotta, NaOH a 25 %.

Ajuntam-se a cada um 5 cm<sup>3</sup> de HNO<sub>3</sub> diluido, e equalam-se os volumes com agua destillada (mais ou

menos 45 cm<sup>3</sup>) e, finalmente, 2 cm<sup>3</sup> do reactivo strychninomolybdico, completando-se o volume com agua destillada.

Precipita-se o phosphomolybdato de strychnina.

Dentro de 20 minutos, a precipitação é completa e pode-se proceder a dosagem nephelometrica.

Enchem-se os tubos até a marca como já nos referimos (pag 26).

Procede-se a comparação das intensidades luminosas a varias alturas.

Cada dosagem exige um minimo de cinco leituras.

Tiram-se as médias e estabelece-se o calculo como para colorimetria.

Seja o exemplo :

$$C = \frac{C_1 \times E_1}{E}$$

$$C_1 = 0,00003 \text{ de } P_2O_5$$

$$E_1 = 16,50 \text{ (media das leituras)}$$

$$E = 20,65 \text{ ( " " " )}$$

$$0,00003 \times 16,50$$

$$C = \frac{0,00003 \times 16,50}{20,65} = 0,00002397 \text{ (} P_2O_5 \text{ em 0,1 de plasma ou } 0,2397 \text{ o/}_{100}\text{)}$$

Como lecithina di-stearica = 1,362 (0,2397 × 5,6853, factor).

Ha muitos outros processos microchimicos de dosagens de phosphatides.

Todos, porém, consistem na sua oxydação para H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Greenwald, baseado em que o teor de P lipoidico do sangue é incomparavelmente superior ao dos proteicos, propoz a dosagem dos phosphatides pela precipitação das proteinas sericas com o reactivo aceto-picrico, os phosphatides precipitando-se por adsorpção.

O precipitado é recolhido por centrifugação e oxydado pela mistura de Neumann.

Procede-se a nephelometria depois da precipitação strychnomolybdica.

Iversen pratica a primeira parte do processo Grenwald, porém, para a determinação do phosphoro, prefere o processo volumetrico, precipitando o  $H_3PO_4$  pelo  $(NH_4)_2 MoO_4$  em solução nitrica, recolhendo o precipitado em um filtro, lavando-o varias vezes, pon-do-o em um balão, eliminando a ebulição o  $NH_4$  por uma quantidade conhecida de uma solução titulada de NaOH.

Determina-se alcalimetricamente o excesso de NaOH e calcula-se para  $P_2O_5$ .

Iversen toma 0,3 a 0,5 de sangue e Fraenkel acrescenta: «Man kann ohne Schiwerigkeit auch mit der halben Menge arbeiten». (1) Verificamos ser um bom methodo.

Bang procede a dosagem dos phosphatides por nephelometria, depois da precipitação do  $H_3PO_4$  pelo  $AgNO_3$ .

Joh Fleigl recommenda o processo de Bloor, substituindo a dosagem strychnomolybdica pela de  $Ag_3PO_4$ , ambas ao nephelometro.

Praticamos a dosagem dos phosphatides no extracto, como Bloor, porém com os reactivos de Kleinemann.

Ha microdosagens gravimetricas ao phosphomolybdato de ammonio, etc.

Ha-as tambem colorimetricas.

---

(1) Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden v. 53—1922, pag. 123.

### Dosagens da cholesterina

*Processo de Victor* {Mayer e de E. Wardel. 1 cm<sup>3</sup> de sangue, secco em 5 gr. ]de CaSO<sub>4</sub> e extrahido 1/2 hora com CHCl<sub>3</sub> no extractor electrico.

Dosagem colorimetrica pela reacção Liebermann-Bouchard, empregando-se o colorimetro Dubosc, por comparação com solução de naphtol grün.

*Processo Csonka*. 2 cm<sup>3</sup> de sangue saponificados 1 hora ao refrigerador ascendente com 4 gr. NaOH em 20 cm<sup>3</sup> de alcool absoluto.

Extrahe-se ao ether, evapora-se e retoma-se pelo chloroformio.

Dosa-se a cholesterina colorimetricamente ao Dubosc pela reacção Liebermann-Bouchard.

*Processo Weston*. 3 cm<sup>3</sup> de soro extrahidos 24 horas ao alcool a 95°, temperatura 60°; depois 24 horas com ether ao Soxhlet.

Saponifica-se o extracto com 2 gr. de NaOH. Retoma-se pelo ether. Evapora-se, dissolve-se o residuo no CHCl<sub>3</sub> e faz-se a dosagem colorimetrica pela reacção de Salkowsky ao colorimetro Dubosc.

*Processo Autenrieth e Funk*. 2 cm<sup>3</sup> de soro aquecidos 2 horas ao banho maria com 20 cm<sup>3</sup> de solução KOH a 25 %.

Extracção ao ether ou ao CHCl<sub>3</sub>. Dosagem colorimetrica ao Dubosc.

Reacção Liebermann—Bouchard.

*Processo Bang*. Papel molhado em sangue, por picada de dedo, pesado e extrahido ao ether de petroleo e alcool absoluto. Dosagem da cholesterina pelo processo de Windaus.

*Processo Grigaut*. 2 cm<sup>3</sup>, saponificação alcoolica. Extracção ao ether.

Evapora-se. Retoma-se pelo  $\text{CHCl}_3$ . Dosagem colorimetrica.

Como muitos outros, elle se basea na reacção Liebermann-Bouchard.

A dosagem se faz por comparação das colorações das soluções a dosar e da padrão.

Esta ultima se obtem dissolvendo 0,6 (Grigaut) 0,5 (Csonka) 1 gr. (Weston), etc. de cholesterina em 1.000  $\text{cm}^3$  de chloroformio.

Procedem-se as dosagens com 1 a 5  $\text{cm}^3$ .

Tomam-se dois tubos graduados contendo as soluções A e B e adicionam-se-lhes para cada 5  $\text{cm}^3$  2  $\text{cm}^3$  de anhydrido acetico  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  e 0,1 de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

Põe-se na estufa ou em banho-maria á temperatura de 30° a 35° em logar escuro. 15 a 20 minutos depois, procede-se no colorimetro a dosagem por comparação das intensidades das colorações, pela differença das espessuras, depois de egualados os niveis pela addicção de chloroformio.

Antes que termine a descripção do processo, acho conveniente lembrar algo que se não encontra constantemente nos autores.

Pela volatilisação do chloroformio, a cholesterina vae-se destitulando e, no fim de algum tempo, obtêm-se resultados baixos. (1)

O chloroformio do commercio contem frequentemente impurezas que perturbam a reacção. Convem lavá-lo varias vezes e destillal-o.

Por qualquer motivo podem penetrar no tubo em que se faz a reacção vestigios de agua que a perturbariam grandemente.

---

(1) A solução chloroformica é um máo processo de conservação da solução padrão sobretudo entre nós. Preferimos fazer a dissolução da cholest. em alcool, pipetando a quantidade para dosagem, evaporando-se o alcool e retomando pelo chloroformio.

Por isso o chloroformio deve ser completamente anhydro.

Faz-se então o calculo da dosagem pela seguinte equação :

$$C : C_1 = E_1 \cdot E \text{ ou } C = \frac{C_1 \cdot E_1}{E}$$

C = concentração da solução desconhecida  
C<sub>1</sub> = » da solução padrão  
E e E<sub>1</sub> as espessuras respectivas.

Ha processos iodometricos e nephelometricos, estes ultimos recentes; porem de todos elles nenhum se compara ao de Windaus pela sua magnifica exactidão.

#### *Processo de Windaus*

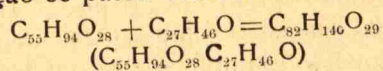
Consiste na precipitação a quente do complexo digitonina-cholesterina, das suas soluções alcoolicas .

O complexo formado é pouco soluvel no alcool e se deposita crystallino pelo resfriamento, depois de repouso mais ou menos longo.

Emprega-se como reactivo uma solução a 1% de digitonina no alcool a 95°.

A cholesterina deve estar tambem em solução alcoolica.

A reacção se passa entre mollecula e mollecula :



O composto resultante é quatro vezes o peso da cholesterina e tão volumoso que com 0,0001 gr. de cholesterina se percebe nitidamente.

Menor quantidade se pode revelar em preparação microscopica.

O digitonide de cholesterina precipita-se em finas agulhas que se agglomeram radialmente em forma de rosetas.

O precipitado é recolhido em Gooch, lavado ao alcool e ao ether, secco em estufa a 100° a 105°, durante meia hora, e pesado.

Calcula-se pela seguinte equação, na qual A representa o peso do producto de addição (cholesterina, digitonina) C, o da cholesterina.

$$A : C = 1589,06 : 386,35 \text{ donde}$$

$$C = A. \text{ o, } 2431$$

Na falta de Gooch, pode-se recolher o precipitado, como o temos feito muitas vezes, em filtro quantitativo, tarado e secco a 100°.

Como exemplo da exactidão do processo, fornecemos as seguintes dosagens em quantidades microquímicas, pelas quaes se vê que os resultados obtidos se comparam perfeitamente aos calculados :

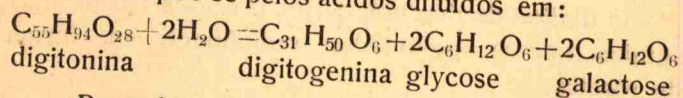
Cholesterina calculada	Cholesterina achada
0,000193	0,000189
0,000386	0,00038
0,00115	0,00115

A digitonina é um glycosíde que se encontra nas sementes e nas folhas da digitalis das quaes se extrae por maceração no alcool.

Obtem-se em crystaes aciculares, soluveis em agua e alcool diluido, insolavel em ether e hycrocarburetos.

Pertence ás saponinas que se ordenam na formula geral  $C_n H_{2n-16} O_{28}$

Decompõe-se pelos acidos diluidos em :



Baseados na riqueza em hydratos de carbono da mollecula da digitonina, formulamos um novo processo de dosagem que seria a sua decomposição hydro-



lytica, á custa de ácidos mineraes diluidos a quente, em meio alcoolico.

Para isso, tivemos que adaptar o processo de Bertrand á microchimica, estabelecendo precisamente uma tabella entre 0,1 a 10 milligrammos de glycose calculando em equivalentes Cobre e  $\text{KMnO}_4$  n/100.

Confessamos, porém, que o processo não leva grande vantagem ao ponderal de Windaus, porque o numero de manipulações necessarias se comparam.

De outro lado, ha sempre vantagem em se recuperar a digitonina para novas dosagens, não só pelo seu preço elevado como pela sua raridade.

Para se a reaver, submete-se o complexo ao xylol em ebulição—a cholesterina se dissolve e a digitonina insolubilizada é recolhida em um filtro.

Não encarecemos o valor biológico do processo de dosagem da cholesterina que apresentamos, porque seria necessário encarecer o da própria cholesterina.

Applicavel até 0,0000038635 onde só conseguem alcançar as microbalanças ao millesimo do milligrammo, temos verificado que elle está além do limite do processo colorimetrico.

Sua technica simples, rigorosamente observada, ao alcance dos não chimicos, permite uma applicação mais geral do que não tiveram os até hoje propostos.

Exigindo uma pequena quantidade de material, a sua condição de applicação é aquella para que foi creado—microchimica.

Não é necessario mais que 0,1 cm<sup>3</sup> de sangue, soro ou plasma.

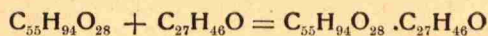
Trabalhamos no sentido de applical-o a dosagens sobre lamina, á platina do microscopio.

.....  
Basea-se o nosso processo de dosagem da cholesterina em:

- a) que a cholesterina se adiciona quantitativamente á digitonina;
- b) que a addição se faz, mollecula a mollecula;
- c) que o complexo é absolutamente neutro á hemolyse;

d) que a digitonina é altamente hemolytica; um ligeiro excesso se poderá revelar pela hemolyse.

Pela equação:



vemos que as soluções de digitonina e cholesterina se correspondem em igualdade de titulo.

Obtemos as nossas soluções dissolvendo 0,38635 de cholesterina e 1.202 de digitonina respectivamente em 1.000 cm<sup>3</sup> de alcool absoluto.

Para a digitonina, porem, a dissolução não se consegue, si não se baixa o teor do alcool a 95°.

Estas soluções correspondem ao titulo n/ 1.000, cada cm<sup>3</sup> neutralizando-se reciprocamente..... (0,00038635 = 0,001202).

Muito faceis de se obter com productos puros por dissolução da quantidade theorica. (1)

Como um delles pelo menos se pode obter em estado de completa pureza— a cholesterina, titula-se com ella a digitonina, como se deprehenderá das nossas experiencias.

Conservam-se as soluções em frascos arrolhados a esmeril e em logar fresco.

O material necessario consta de pipetas divididas em 0,1 e 0,01 do cm<sup>3</sup>, tubos de ensaio ordinarios ou de dimensões um pouco superiores aos que commumente se usam nas reacções hemolyticas.

Solução physiologica a 8‰.

Uma piseta com alcool a 95°.

---

Empregamos cholesterina Khalbaum e digitonina Merck.

Emulsão a 1% de globulos lavados em sôro physiologico.

Como trabalho previo, tivemos que determinar o indice hemolytico da digitonina e o encontramos igual

$$a \frac{1}{100.000}.$$

As nossas experiencias foram realizadas em tubos de ensaio ordinarios, pipetando-se uma quantidade invariavel de cholesterina titulada á qual ajuntamos quantidades progressivamente crescentes de digitonina egualmente titulada.

Depois de lavadas as paredes do tubo com 1 a 2 cm<sup>3</sup> de alcool a 95°, aquecem-se as soluções alcoolicas á ebullicão, agitando-as constantemente até que todos os vapores se desprendam completamente.

Com a necessaria precaução, evitam-se facilmente as perdas por projecção do liquido, bem como qualquer perigo de fogo.

Depois de elliminado todo o vestigio de alcool e resfriado o tubo, põe-se 1 cm<sup>3</sup> da solução de sôro physiologico e 1 a 2 gottas da emulsão globular.

Deixa-se em repouso.

A hemolyse é tanto mais rapida, quanto maior a quantidade de digitonina livre.

Cinco minutos depois, a leitura poderá ser feita, mas, como pode haver casos duvidosos, o melhor será fazel-a duas horas depois.

Os tubos são conservados á temperatura do laboratorio.

Pelos quadros que apresentamos, percebe-se claramente a possibilidade de uma determinação quantitativa da cholesterina, em processo volumetrico.

Eil-os :

	Testemunhas										
Cholesterina.....	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0
Digitonina.....	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	0,1
Soro physiologico....	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.	lcc.
Globulos.....	1gt*	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Resultado (hemolyse).	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Vê-se que a hemolyse começa onde ha excesso de digitonina sobre cholesterina.

As nossas primeiras pesquisas foram feitas variando 0,1 do em<sup>3</sup>, porém como os erros são ali bastante elevados, effectuamos a reacção no seu limite.

Os quadros reproduzidos dizem melhor do que qualquer explicação :

Cholesterina.....	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
Digitonina.....	0,01	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04
Sôro.....	1cm <sup>3</sup>	=	=	1cm <sup>3</sup>	=	=
Globulos.....	1gt <sup>a</sup>	=	=	1gt <sup>a</sup>	=	=
Resultado (hemolyse).....	-	-	+	-	-	+
Cholesterina.....	0,04	0,01	0,01	0,05	0,05	0,05
Digitonina.....	0,03	0,04	0,05	0,06	0,06	0,06
Sôro.....	1cm <sup>3</sup>	=	=	1cm <sup>3</sup>	=	=
Globulos.....	1gt <sup>a</sup>	=	=	1gt <sup>a</sup>	=	=
Resultado (hemolyse).....	-	-	+	-	-	+

Cholesterina.....	0,06	0,06	0,07	0,07
Digitonina.....	0,05	0,06	0,07	0,08
Séro.....	1cm <sup>3</sup>	=	1mc <sup>3</sup>	=
Globulos.....	1gt <sup>a</sup>	=	1gt <sup>a</sup>	=
Resultado (hemolyse).....	-	-	-	+

Cholesterina.....	0,08	0,08	0,09	0,09
Digitonina.....	0,07	0,08	0,08	0,1
Séro.....	1cm <sup>3</sup>	=	1cm <sup>3</sup>	=
Globulos.....	1gt <sup>a</sup>	=	1gt <sup>a</sup>	=
Resultado (hemolyse).....	-	-	-	+

Dosagem de uma solução de cholesterina.

Antes de quaesquer preparativos para determinação quantitativa, faz-se necessario conhecer o teor approximado da cholesterina do liquido a examinar, estabelecendo-o por tentativa. Para isso se opera em largos limites.

Raramente são necessarios mais de dois ensaios.

Com uma prova intermediaria, encurta-se da metade o numero de operações.

Põe-se em tubos seriados uma mesma quantidade pipetada da solução alcoolica de cholesterina e quantidades progressivamente crescentes da solução titulada de digitonina.

Evapora-se o alcool á ebullição, etc., procedendo como já dissemos atraz.

Depois de um repouso de duas horas, faz-se a leitura.

Si se está seguro da quantidade approximada da cholesterina, a hemolyse deverá começar nos tubos intermediarios ás duas provas já conhecidas por tentativa.

Como as soluções se equivalem, volume a volume, ha hemolyse onde a digitonina está em excesso.

Consideramos o termo da reacção aquelle que precede immediatamente ao tubo em que se dá a hemolyse, mas, se neste tubo parece haver um ligeiro grau de hemolyse, toda a duvida se elliminará, centrifugando-o.

Os globulos devem sedimentar-se e o sôro não será hemoglobico.

Calculo :

Seja elle equivalente a 0,15 da solução de digitonina; multiplicam-se estes centesimos de  $\text{cm}^3$  por....  
0,00038635.

$$0,15 \times 0,00038635 = 0,00005795.$$

A prova foi effectuada em 0,1 de  $\text{cm}^3$ , portanto contem em cholesterina 0,5795 ‰.



### **Hemolyse pela digitonina**

A hemolyse é um precioso indicador das reacções humoraes e sel-o-ia tambem em chimica, si os recursos de que dispõe esta sciencia não fossem tão exiguos como os immunologicos, por isso que uma infinidade de substancias pode produzi-la independentemente da collaboração de quaesquer outras circumstancias.

A extrema vulnerabilidade dos globulos vermelhos ás mais variadas acções physicas e chimicas fazem com que as respondam pela sua desorganização histologica:—mudança de tensão osmotica das soluções salinas e outros electrolytos, acção de colloidaes, dos dissolventes das gorduras e lipoides, de productos vegetaes, assim como de grande numero de substancias syntheticas.

O phenomeno não admite uma unica explicação, dada a multiplicidade de agentes, a organização physica e constituição chimica particularmente curiosa dos globulos vermelhos. A alta especialização destes elementos para a funcção respiratoria modificou profundamente sua morphologia em detrimento da vitalidade cellular.

A hemoglobina que preenche as malhas do stroma globular, como outras substancias, a glycose, existem ahi taes quaes.

E' um facto fundamental em metabolismo cellular a transformação colloidal dos crystalloides absorvidos.

Amobilidade extrema das moleculas crystalloidicas parece incompativel com a organização vital.

A forma de assimillação dos hydratos de carbono é a glycose, como a das proteinas são os peptides e aminoacidos.

A digestão dos colloides alimentares fal-os perder a especificidade de origem e os crystalloides de que se compõem se aggregam singularmente na construcção de molleculas novamente especificas, porém colloidaes.

O amido é transformado em glycose que, facilmente diffusivel, as cellulas não o guardariam para suas necessidades energeticas, si um processo de colloidisação não a transformasse em glycogeneo.

Os globos vermelhos, no emtanto, conservam-n'ò no estado primitivo de glycose.

Si um metabolismo existe para elles, este deve ser um tanto diverso do das demais cellulas do organismo.

A sua relativa passividade ás acções externas parece demonstral-o.

Tem-se feito da physiologia do globulo uma questão de membrana.

Para Overton e Hans Meyer, todas as cellulas do organismo seriam limitadas por uma camada de lipoides extremamente delgada.

A liposolubilidade condicionaria electivamente as permutas.

Esta hypothese, acceita com reservas, parece mais applicavel ao globulo vermelho que a qualquer outro elemento cellular.

De facto, a hematia é ricamente lipoidica e dos lipoides mais que das proteínas parece depender a sua hemipermeabilidade.

Tem-se objectado a theoria com o facto da hemo-lyse em meios hypotonicos.

A pretensa insolubilidade dos lipoides não explicaria o phenomeno.

Ha lipoides soluveis em agua e os phosphatides, como colloides hydrophilos, abservam-n'a grandemente.

Tem-se encontrado, fazendo parte do chimismo das hematias, um grande numero de lipoides — galacto-

sides, sulfatides, em pequena quantidade, predominando os phosphatides e a cholesterina.

A hemolyse produzida por certas substancias, em meios isotonicos, se explicaria por uma acção sobre os lipoides, seja combinando-se a algum delles, seja dissolvendo-os, seja emfim lysando-os por hydrolyse.

A cholesterina impede a hemolyse, os phosphatides a favorecem.

A combinação se faz electivamente a um delles. Certos venenos animaes parecem agir, ora sobre a lecithina, ora sobre a cholesterina.

Ha uma classe de substancias vegetaes altamente hemolyticas que se combinam á cholesterina formando esterres. São as saponinas.

Por analogia com os venenos animaes, chamaram-n'as toxinas vegetaes, sapotoxinas.

Todas ou quasi todas as substancias deste grupo se combinam a cholesterina á maneira de um complexo.

Ora mollecula a mollecula (digitonina, cyclamina), ora na razão de 2 de cholesterina para 3 de saponina (dioscina).

Windaus baseou-se em um delles — cholesteride de digitonina para uma dosagem ponderal.

## BIBLIOGRAPHIA

---

- Kolloidchemie, Zsigmondy—1921.  
Lehrbuch der Physiologische Chemie Paul Hari—1918.  
Nukleoproteide, Nukleinsäuren und ihre Abbaustudien. Hen-  
nam Stendel, Thannhauser E. Winterstein—1920.  
Physiologisches Praktikum Max Verworn 5. Auflg —  
1921.  
Die Blut Gerinnung, Paul Morawitz 1921 Hand, der biolog.  
Arbeit. fg. 43.  
Kolloidforschung—Alfred Lottemoser—1922.  
Methoden der Teilchengröße—Hans Handowsky—1922.  
Lehrbuch der Physiologie—Max von Frey—1921.  
Physiologie der Menschen—Landois—1916.  
Anwendung von Adsorption und Kapillarität zur biochemi-  
schen. Victor Grafe Arbeitsmeth—1920.  
Microgasanalyse, H. Staub—Arbeits 10—1920.  
Biophysik—O. Weis—1919.  
Biochemie—Oppenheimer—1919.  
Das Fermentproblem—Andor Fodor—1922.  
Fermentstudien—Neue Methoden zum Nachweis proteoly-  
tischer und lipolytischer Ferment mit besonderer Berücksichti-  
gung der Abwehrferment—P. Hirsch—1917.  
Schutzfermente der tierischen Organismus—Emil Abder-  
halden—1912.  
Die Arzneimittel—Synthese—Sig. Fraenkel—1921.  
La catalyse en Chimie Organique—Paul Sabatier—1920.  
Einführung in die experimentelle Therapie —Martin Ja-  
coby—1919.  
Die Wirkung von Gift und Arzneistoffen—Ernest Frey—  
1921.  
Hematologische Technik—Schridde, O. Naegeli—zw. Aufl—  
1921.  
Die experimentelle Pharmakologie, Meyer und Gottlieb—  
1914.  
Die Kolloide in Biologie und Medizin—Bechhold—zw.  
aufl—1920.

- Beiträge zu einer Kolloidchemie des Lebens. Liesegang—1922.  
Analyse der Zelle—Arthur Meyer—1921.  
Compendio di tossicologia pratica—R. Kobert trad. do all.—1915.  
Handbuch der Ernährungslehre—Charl von Noorden W. Solomon—1920.  
Analyse des corps gras et cires—Chercheffsky—1903.  
Traité de Physiologie—Morat et Doyon 1—4 vol.—1902—1918.  
Traité de Physiologie—Gley—1918.  
Untersuchung über physiologische Permeabilität der Zellen—Louis Choquard—Zeits. für Biologie—Band. 1913.  
Contribution à la connaissance de la physiologie des subst. grasses et lipoidiques—Emil Terroine—1920.  
Praktikum der medizinischerchemie—Fränkel—1921.  
Ueber Lipämie—Fritz Eichholtz—Biochem. Zeits—Bd—128 1922.  
Ueber die Adsorption von Fermenten und Zimogenen Jacoby, Martin—idem.  
Die Oberflächenaktivität und die Giftwirkung der saponine—Ludwig—Kofler—Biochim. Zeits Bol. 129—1922.  
Zur Kenntnis des Metacholesterins und seiner Nebenprodukte—Löffschütz—idem—1922.  
Guide pour les manipulations de chimie biologique—Bertrand—1913.  
Das Wesen der Geistkrankheiten und deren biologisch-chemische untersuchungen—A. Justschenko.  
Methoden zum Nachweis und zur Erkennung ungesättigter Verbindungen—H. Bauer—Arbeits—1921—37.  
Précis de Biochemie—Lambling—1919.  
Text book of Physiological chemistry—Hammarsten—1915.  
Traité de Chemie Organique—trad. franc. Richter—1910.  
Pathologische Physiologie—H. E. Hering—1921.  
Lehrbuch der Physiologische Chemie—Abderhalden—2 Bd 1920.  
A Laboratory Manual of biological chemistry—Otto Folin—1916.  
Les lipoides dans l'infection et dans l'immunité—Linosier—1920.  
Die Neue entdeckten lebenswichtigsten Nahrungstoffe—Vitamine—Willy Weitzell—1921.  
Proteine—Arbeits Bd 60 1922.  
Le sucre du sang—R. Lepine—1921.  
Chemical Pathology—Wells—1917.  
Prüfung und gebräuchlichsten Lösungen und Reagentien auf Reinheit—Paul Hirsch—1921.  
Abbau und Aufbauversuche im Gebiete der Sterine—Windaus 1922.  
Journal de Pharmacie et de Chemie—1914—n. 3 e 4.  
Nachweis, Isolierung, Abbau und Aufbaustudien auf dem gebiete der Saponine—Sieburg—1921.  
Mikromethodik—Pincussen—1921.

- Beitrage zur Frage der Lipoiden Fermenten—Eckstein Zeits  
f. Immunitätsforschungs und exp. Therap. Bd 18.  
Untersuchung der Kholenwasserstoff Ole und Fett—Holde  
—1918.  
Contes rendus de la Soc. de Biol.—1907—1922.  
Mayer et Schaeffer—Recherches sur la teneur des tissus en  
lipoides—R. Physiol. et Pathol. Général—1913.  
Fränkel Fette, Phosphatide, Sterine—1922.  
Annales de l'Institut Pasteur—1910—1922.  
Physikalische Chemie der Lipoide—S. Loewe—Biochem.  
Zeits Bd 127—1922.  
Viscosität und ultrafiltrationsgeschwindigkeit von Serum—A.  
Ellner Neuschundlosz.  
Methoden zur Erforschung der feineren Struktur von Gelen  
und Gallerten—Liesegang | Arbeitsmeth—1920.  
Mikroelementaranalyse mit Einschluss der Halogenbesti-  
mung nach Fritz Pregl—Hans Lieb Arbeitsmeth—1921.  
Halbmikroelementaranalyse J. V. Dubsy—1921.  
Bulletin de la Societé Chimique de France—1920 1922.  
Die Resorption der Monoglyceride der höheren Fettsäuren  
O. Frank—Zeits für Biologie Bd 59.  
Weitere Untersuchungen über die Unentberlichkeit der Li-  
poide für das Leben—Wilhelm Stepp | Zeits für Biologie 59 Bd.  
Versuche über Benetzung—Emulsion—Agglutination und  
Verwandte Erscheinung. Hoffmann. E. B. Zeits. f. Biologie  
Bd 60.  
Der Einfluss der Nervensystem auf die Mobilisierung von  
Fett, G. Mansfield Plüger's Archiv für die Gesamt Physiologie  
—Bd 152.  
Betrachtung über der Rolle der Lipoid bei Blutgerinnung  
Bordet et Delange Arch. f. Exp. Path. und Pharm. 71 Bd.  
Chemische und Morphologische Untersuchungen über Be-  
deutung der Cholesterin in Organismus. Ibd Bd. 74.