

# Trabalhos originaes

---

## Dosagem da bilirrubina direta e indireta Interesse clinico e laboratorial

por

Mario Bernd  
do Instituto Osvaldo Cruz de Porto Alegre

Sendo a côr um acidente da materia, isto é, não podendo existir sem substrato, sem substancia, natural é que nesta se procurasse o factor do fenomeno. Apesar, outrossim, de ser a côr para nossos olhos o resultado de vibração luminosa refletida, é certo que esse mesmo facto depende do arranjo e da natureza atómico-electronica dos corpos.

O espirito humano gosta de exprimir as cousas de modo causal. E é porisso e nessa ordem de idéas qua ha muito se vem dizendo que o ferro é o pintor da natureza.

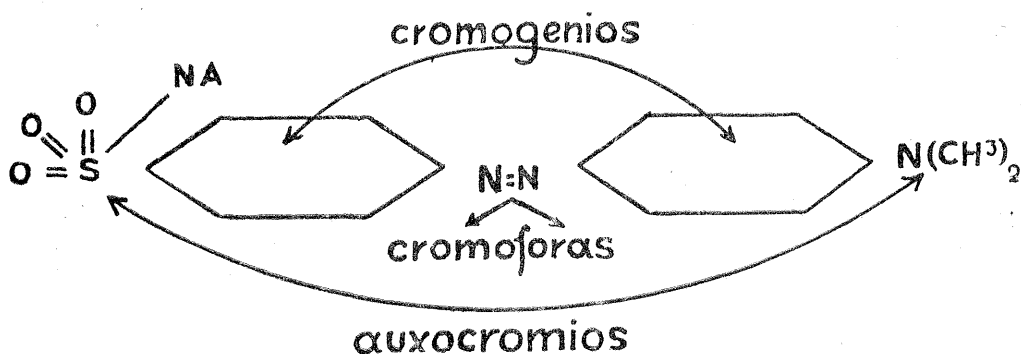
E, com efeito, basta que nos lembremos dos nomes de minéreos de ferro, limonito, hematito, para não falar no barro vermelho, na clorofila, onde se dizia que o ferro age qual cromo-catalitico, hemoglobina, para vermos a procedencia no asserto.

Mas não é só o ferro, o incriminado como autor de pintura no universo, tambem o cobre, magnesio, manganês, vanadio e outros (Polonowski) (1).

Mas, podia-se perguntar si em muitos casos o ferro entra como elemento cromogenico, a coloração seria exclusiva dele ou interferiria algum outro factor que restringisse a amplitude daquela afirmação, pela ação exclusiva, pela cooperação, como concausa.

Ha uma outra inexgotavel e vastissima serie de corpos, mas de natureza organica que contribuem para formação de côres. Nem é bom falar nas anilinas. Mas eu queria ressaltar o papel de certos nucleos organicos que condicionam a coloração nos seres vivos. Interessei-me por este assunto desde que me capacitei de que a hemoglobina, a hemocianina e a clorofila não deviam sua côr exclusivamente ao factor metalico, mas tambem a certos agregados fundamentais de sua molecula.

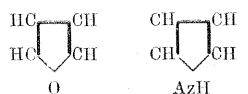
Antes, porém, de dizer algumas palavras sobre este particular e para compreensão melhor do que vêm, friso não ser sufficiente estar corada uma substancia para ser corante. Essa póde ser até um cromogenio, mas si não tiver os grupos cromoforo e auxocromio não será corante. Assim o metilorangio, um dos melhores indicadores de iontes acidos livres:



(Barros Terra) (2).

Que certos nucleos organicos cíclicos têm papel preponderante na formação de reações coradas, já dos estudos elementares de química biológica se pode verificar.

Assim nos glucídeos encontramos o furfural explicando certas reações como a de Molisch, a de Seliwonof, a de Tollens, a de Bial, etc.

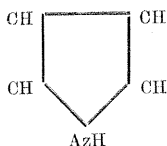


(furanio) (pirrol)

Nos lípides as de Salkowski, Schiff, Liebermann-Burchardt, a propósito de colesterol.

Nos protídeos, a xantoproteica (tirosina, triptofano), a de Millon (tirosina), a de Colc e Hopkings (triptofano), etc., etc....

Mas o interessante é que da maioria destas reações concluímos, a relevância de um nucleio fundamental comum o pirrol.



Mas o mais interessante é que os pigmentos normais ou anormais do organismo: hematina, bilirrubina, urobilina, porfirina, a mesma clorofila e seus derivados apresentam nucleos pirrólicos associados, como pedra angular de seus edificios moleculares. Da mesma forma o colesterol e os ácidos biliares. (Polonowski) (3).

Explica-se assim que o hormônio antianêmico não podendo utilizar os ácidos aminados triptofano e prolina, de nucleos pirrólicos (por aquilia e aquinia), não pode arquitetar a molécula de hemoglobina.

O estudo comparativo da estrutura química destes corpos facilita, uniformiza, simplifica em sua visão de conjunto o conhecimento do metabolismo pigmentar. Mas isto levar-nos-ia muito longe.

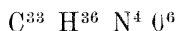
*Existencia. Séde. Origem. Constituição da bilirrubina*

A bilirrubina que no sangue de cão não existe, é fisiologica no do homem na proporção de 2 a 5 miligramas por litro. (Varela) (4).

Com exceção de Whipple, todos os autores admitem-lhe a origem da hematina. (Rondoni) (5).

A bilirrubina retirada da bilis em solução cloroformica cristaliza em laminas monoclinicas. Purifica-se pela transformação em bilirrubi-nato de amonio.

A analise conduz á formula bruta



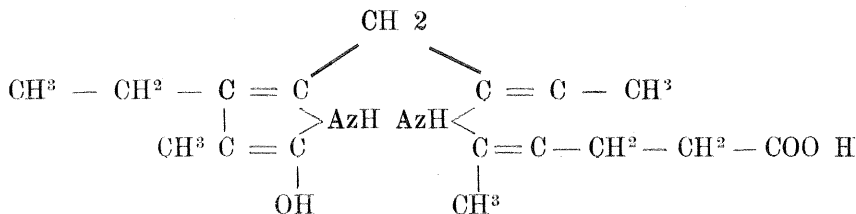
Difere da hematina (  $C^{34} H^{33} N^4 O^5 Fe$  ) por um atomo de ferro e um de carbono, a menos, e um atomo de oxigenio a mais:

Os produtos de oxidação e redução são os seguintes (Emselme) (6):

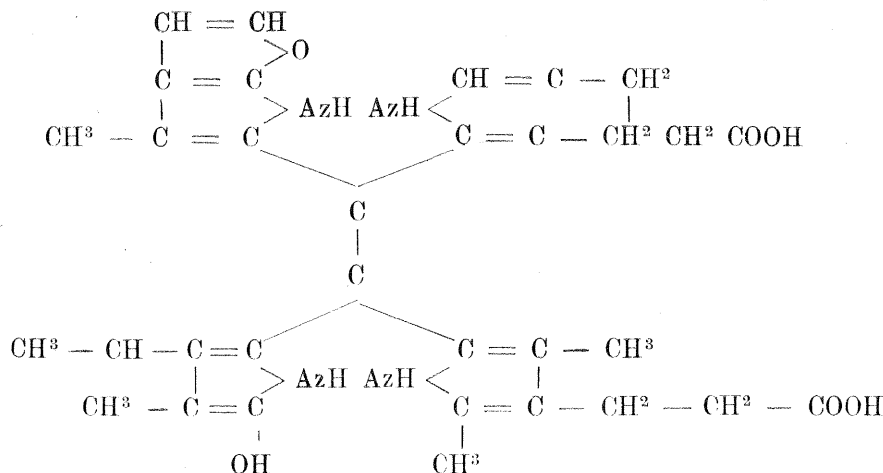
a) Uma oxidação suficientemente energica para romper a molecula fornece 30% de materia prima sob forma de acido hematico (Küster). Até aí nota-se grande analogia com a hematina.

b) Redução leve permite ir até a mesobilirrubina  $C^{33} H^{40} O^6$  que por oxidação, dá além do acido hematico uma imida metil-etilma-leica, o que permite estabelecer que existem na molecula da bilirrubina agrupamentos pirrolicós desprovidos de funções acidas.

Redução mais intensa tal como a que permitia desprender dos agrupamentos pirrolicos da molecula de hemina, não dá aqui sinão pouco pirrol, obtendo-se pelo contrario um acido designado sob o nome de acido bilirrubinico cuja constituição é a seguinte:



Destes fatos deduziram-se numerosos esquemas da bilirrubina. Os mais notaveis são os de Hans Fischer, que recebeu o premio Nobel em 1928 por estes trabalhos.



Ha uma porção de formulas isomericas da bilirrubina, diferentes por suas propriedades fisicas: solubilidade, coloração, etc. e que uma bilirrubina conservada mesmo a seco está em continuas transformações.

Javillier esquematizou em tres operações sucessivas a metamorfose da hematina em bilirrubina.

a) A hematina perde Fe que é substituido por 2 átomos de H.

b) As pontes carbonicas entre pirrois 1 e 2 de uma parte e 3 e 4 de outra rompem-se enquanto um átomo de carbono é eliminado por formação de dois aldeidos que, por uma reação de Canizaro, dão um acido-alcool.

O carboxilio elimina-se sob forma de  $\text{CO}_2$  e a molecula perde assim um átomo de carbono.

c) Emfim, intervem oxidação que transforma dois dos grupos pirrolicos em agrupamento oxipirrolicos.

No conjunto, estas diversas transformações (oxidação, redução, hidratação ou carboxilação) são frequentemente encontradas nos seres vivos, não lhe trazendo a realização nada que nos deva surpreender.

As provas fisiologicas de transformação da hematina em bilirrubina são inconcussas.

Já Virchow em 1847 a suspeitára, ao achar hematoidina nos focos hemorragicos. Bumstead e Rich dizem que não ha nenhum método fisico ou químico que permita diferenciar esses dois corpos: a hematoidina e bilirrubina.

Stadelman acha certa a filiação da bilirrubina e hematina. Pois qualquer excesso de hemoglobina, liberta no sangue, faz aparecer consequentemente quantidade anormal de bilirrubina.

Conforme Basabe (7) o organismo humano destroi diariamente de 50 a 100 cc. de sangue ou 1/100 ou 1/50 do volume total. A secreção diaria de bilis corresponde a 0cc.,5 por hora e por kgr. de peso, cujo calculo em um homem de 70 kgrs. daria secreção de 800 cc. por dia.

17 grs. de sangue fornecem 0gr.,1 de bilirrubina.

*Onde se forma a bilirrubina?*

Não gosto de “*contar leituras*”, mas é preciso dizer que do digladiamento de varias escolas, quem sabe apaixonadas por seus “partipris”, poderia concluir o seguinte: A bilirrubina é formada no sistema reticuloendotelial, sofrendo na sua travessia hepatico-excretora leve modificação.

Os que, argumentando a favor da origem hepatica exclusiva da bilirrubina, invocavam a diminuição da colemia por hepatectomia, esqueciam-se da retirada simultânea do sistema reticulo estrelado do figado que explicava o deficit de bilirrubina sanguinea. (Nägeli (8a) (Lauda 8b).

O papel biligenico do sistema de Aschoff está intimamente ligado com a função eritrofagica, ou, como dizem agora, com o poder hemocateretico do mesmo, que quer dizer destruidor de sangue.

Calcula-se que o sistema desintegra 1 bilhão de globulos vermelhos por minuto (Varela) (9).

Verificou Lepehne que o poder *cromopectivo* (e não cromopexico) do S. R. E. depende da sua conversão anodica. Quer dizer que as celulas do S. R. E. tem avidez extraordinaria pelos coloides electronegativos. (Ferrata) (10).

Eppinger tambem aproveitou essa propriedade para produzir a inatividade (o assim chamado bloqueio) do S. R. E. De que maneira? Injectando-se, por exemplo, colargol, coloide electro-negativo, o S. R. E. absorve-lo-á rapidamente, ficando suas funções paralisadas (Helion Póvoa) (11).

Ora, verificou-se que nestas condições a bilirrubinemia e a coeresesofriam baixa subita. Logo, pode asseverar-se que a bilirrubina, pelo menos, tambem se forma fóra do figado.

Já se pôde concluir do que precede a existencia no organismo de duas bilirrubinas. Uma que circula normalmente no sangue. Outra que é excretada pelas vias biliares.

Executando o figado a metamorfose da bilirrubina hematica em bilirrubina de excreção, pareceria obvio que, dosando-se essas duas bilirrubinas, se poderia ter idéa do grau de suficiencia hepatica.

Para que ela entre com seu contributo para verificação da hepatargia, é preciso que nos lembremos da multiplicidade das funções da glandula que podem apresentar defeitos singulares, isto é, assinergia que ainda está sob a dependencia do factor terreno e de correlação á distancia tal como o diencefalo. (Clementino Fraga) (12).

Por outro lado, nem sempre a colemia marcha de par com a ictericia. Muitas destas, de prognostico pessimo, podem acompanhar-se de hipercolemia minima. (Fiessinger e Walter) (13).

Dierick (14) acha que terá valor mais rigoroso o teste da colemimetria junto com outras, por exemplo, com a monosuria ou monosemia provocada.

Que quer dizer isto? Fazer ingerir glicose, levulose e galaetose, dosando-se depois na urina e no sangue o glucide.

A glicose teria para ele a desvantagem de sofrer a ação do musculo,

tecidos e da insulina. A levulose não teria tal inconveniente, mas traria desarranjos digestivos.

A galactose seria bem recebida, não sofreria ação tecidual e insulínica, sendo transformada no fígado em glicogenio. (Diego Moxó Queri) (15).

A prova seria simples:

O doente ingere em jejum 40 grs. de galaetose em 200 de agua, dieta de 4 horas. Após 24 hs. examina-se polarimetricamente a urina.

No entanto Dierick de Lovaina faz as seguintes indicações, que darei a titulo de curiosidade:

1.º) Hepatites (ictericia catarral, ictericia grave, atrofia aguda ou subaguda): *galactose*.

2.º) Ictericias mecanicas puras: levulose; se forem complicadas de hepatite: *galactose*.

3.º) Cirroses: *galactoses*.

4.º) Afeções circumscritas do fígado: um das 3 monoses.

5.º) Obesidade, superalimentação com fígado aumentado de volume ou endurecido: *glicose*.

Apesar disso tudo, pode-se afirmar que ha utilidade muito grande na colemimetria, porque praticamente, como diz Henrique Walter (16) não ha lesão hepatica mesmo minima que se não assignale pelo ataque á função biliar. Mesmo que se faça exame plurifuncional, a colemimetria deverá ser a primeira etapa, o primeiro sector de pesquisa.

As vantagens até agora conhecidas seriam:

1) Desvendar uma hipocolemia das anemias aplasticas, pouco profundas, dos tumores malignos, das hemorragias recidivantes, como no ulcus gastrico e duodenal.

2) distinguir uma ictericia hemolitica de outras dependentes de uma hepatose ou hepatite.

3) Distinguir uma anemia perniciosa de uma secundaria etc., etc.

4) Verificar a existencia de bilirrubina de reserva ou lacunar, ou tecidual de Chabrol e Busson (17).

Demais, o prognostico dos disturbios hepaticos seria auxiliado pela verificação da curva colemica.

Mas ainda mais se lucraria si se dosassem em separado as duas bilirrubinas.

Para que se compreenda essa utilidade, é preciso perguntar que é que se sabia e fazia a proposito de colemimetria desde os trabalhos de Hymans van den Berg.

Van den Berg dosava a bilirrubina indirecta e sómente pesquisava a directa.

A bilirrubina indirecta, tambem chamada bilirrubina pura, prebilirrubina de Escudero, funcional de Lephène, acolorica, dinamica, bilirrubina da 1.ª fase, seria a bilirrubina que não tinha sofrido a ação do armazenamento hepatico. (Paulo Krieger: Tese: R. de van den Berg 1927) (18).

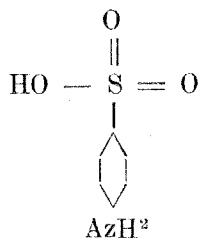
A bilirrubina directa, bilirrubitato de amonio, de estase, mecanica, colorica, da 2.º fase, seria a bilirrubina que por assim dizer teria sido

digerida, desimpurificada ao nível do fígado, podendo assim atravessar facilmente o rim.

Van den Berg aproveitou o reativo de Ehrlich-Pröschner para sua análise. O reativo é constituído de duas soluções, A e B.

A sol. A constitue-se de:

|                   |                |
|-------------------|----------------|
| Agua destilada    | 1000 cc.       |
| HCl               | 5—15           |
| Acido sulfanilico | 1 cc. ou 1 gr. |



(acido sulfanilico)

Solução B:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Nitrito de sodio       | 0,5 grs. |
| H <sub>2</sub> O dist. | 100,0    |

Para se fazer a mistura tomam-se 25 cc. da solução aos quais se adicionam 0,75 cc. da sol. B. Esse é o reativo pronto para a r. de Van den Berg.

A 1 cc. de sôro junta-se 1 cc. desse reativo.

Si dentro de 30" aparece coloração violeta, a reação é dita *direta*, *positiva*, *imediate* ou *pronta*.

Si dentro de 1—15 minutos comparece côr vermelha, lentamente convertida em violeta, a r. chama-se demorada ou retardada.

Sendo negativo o resultado, isto é, não se produzindo coloração nenhuma, é sinal de que não ha bilirrubina direta.

Nessas condições submete-se 1 cc. de sôro á ação de 2 cc. de alcool. Centrifuga-se. A 2 cc. do sobrenadante extraído adicionam-se 0,25 cc. de r. de Ehrlich-Pröschner.

Espera-se um tanto e compara-se a coloração violeta obtida a um estalão cuja origem não vem ao caso aqui descrever.

Para não esquecer é preciso aproveitar o que foi dito e indicar o auxocromio do acido sulfanilico com mais um oxidante, ataca os nucleos pirrolicos da bilirrubina.

Nas doenças em que ha forte hemocaterese inicial como na febre tifoide, os acidos aminados da desagregação hemoglobínica podem subcondicionar na urina uma diazo-reação de Ehrlich positiva.

Como se vê, a reação de Van den Berg conforme se vinha fazendo traz desvantagem:

- 1) Não podia dosificar a bilirrubina direta.
- 2) A dosagem da bilirrubina total do sôro (D e I) não é exata, pois que uma parte dessa bilirrubina é adsorvida e arrebatada pelas albuminas do sôro que são precipitadas pela adição de álcool.

Conforme Varela e Esculies, de Montevideu, que na America foram os primeiros a estudar o assunto, dizem que Tannhauser e Anderson (Deutsches Arch. f. Klin. Med. 1921, T. 137, p. 179), Weltmann e Jost (Deutsches Arch. f. Klin. Med. 1928, T. 161, pg. 203), melhoraram esse metodo e conseguiram impedir essa perda de bilirrubina por adsorção, mas não fazem a separação e dosagem das duas bilirrubinas direta e indireta.

Com apoio nos dados de Collinson e Fowweather (Brit. Med. Journ., 1925, pg. 1081) poudese fazer essa separação.

Estes autores demonstraram que as duas bilirrubinas direta e indireta, mostram diferenças de solubilidade no cloroformio e na agua.

A indireta é muito solúvel no clorof. e insolúvel na agua. O contrario dá-se com a bilirrubina direta.

A tecnica dos autores uruguaiois citados é a seguinte que, aliás, me foi gentilmente enviada em separata dos "Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie de Paris", tomo 107, pg. 884, 1931:

A 0cc.5 de sôro ajuntar treis gotas do reactivo diazo de Ehrlich. (Nota: Utilizamos o diazo de Ehrlich como é prescrito por Van den Berg:

#### Diazo I

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Acido sulfanilico | 1 grama |
| Acido clorhidrico | 15 cc.  |
| Agua distilada    | 1 litro |

#### Diazo II

Nitrito de sodio a 5%

Misturar imediatamente antes do emprego:

Diazo I: 25 cc.

Diazo II: 0cc.75

Si esta diazo-reação direta se mostra *positiva*, será preciso proceder á dosagem da bilirrubina direta contida em tal sôro, após ter separado e dosado a *bilirrubina indireta*.

#### *Extração e dosagem da bilirrubina cloroformo-solúvel (indireta)*

1.º) A 1 cc. de sôro fresco não icterico, ou 0cc.5 no caso de sôro icterico, ajuntam-se 4 cc. de cloroformio.

Agitar um minuto.

Centrifugar.

Obtem-se acima do cloroformio camada com o aspeto de pó branco — amarelado e denso.

Com pipeta de Pasteur, munida de bola, extrae-se quasi todo o cloroformio.

Ajuntam-se novamente 4 cc. de cloroformio ao precipitado.

Agitar.

Centrifugar.

Extrair o cloroformio como antes.

Si se trata de sôro icterico, o cloroformio estará ainda corado em amarelo.

Far-se-á uma ou duas extrações novas.

Após haver reunido estes treis extractos cloroformicos, procede-se á evaporação total do cloroformio com a *trompa de vacuo*, imergindo o tubo em banho maria a 40°.

Termina-se a operação em 5 minutos.

2.º) Dissolver esse residuo com 0cc.,5 de cloroformio.

Agitar.

Ajuntar 1cc.,66 de alcool a 96°.

Agitar.

Ajuntar em seguida 0cc.,4 de diazo fresco.

Desenvolve-se então lentamente coloração vermelho-vinhosa.

Esperar 10 minutos para fazer a leitura no colorimetro.

(Nota: Pode-se usar o colorimetro de Duboseq com a solução padrão de sulfocianato de ferro, frescamente preparada. Emprega-se tambem o colorimento de Autenrieth com a cuba-estalão pronta.

A diluição final para os sôros não ictericos é 1

$\frac{1}{2,5}$

Para os sôros ictericos (partiu-se de 1 cc. de sôro) é de 1 Podem-se fazer novas diluições, si a côr obtida é demasiado escura.

#### *Dosagem da bilirrubina hidrossolúvel (directa)*

O precipitado *que fica* depois das *extrações cloroformicas anteriores*, contém toda a bilirrubina hidrossolúvel agora isolada.

1.º) Começa-se por centrifugar energicamente este precipitado (com 2.500 voltas durante 15—20'), até separação bem nitida em duas camadas: uma superior, liquida, transparente, de côr amarela e camada inferior, semi-solida, de um branco-amarelado.

Decanta-se a camada superior, liquida, em segundo tubo, invertendo rapidamente o primeiro.

Lavar a superficie do precipitado com 2 cc. de agua distilada (que deve ser derramada lentamente sobre a parede do tubo).

Esta agua de lavagem é tambem decantada e reunida ao liquido precedente.

2.º) Procede-se então á dessecação do precipitado permanecido no fundo do tubo.

Para isto introduzem-se duas perolas de vidro nesse tubo.

Faz-se então o vacuo no tubo com a *trompa d'agua*, agitando de

tempos a tempos para favorecer a evaporação do cloroformio, contido nesse residuo.

O tubo é além disso submetido a banho maria a 40°.

Termina-se deste modo em 5 minutos a dessecação total.

Deve-se fazer desaparecer o ultimo resquicio de cloroformio para evitar obter menor turvação no liquido final que se utilizará para a colorimetria.

3.º) Dissolver o precipitado com 2 cc. d'agua.

Agitar para dissolver.

Ajuntar então os dois liquidos de decantação que se haviam separado na primeira operação.

Agitar.

O liquido pôde apresentar-se turvo.

Nesse caso ajuntar então agua até o volume de 4 cc.,3.

Adir agora 0cc.,7 de diazo.

A turvação desaparecerá completamente, ao passo que se irá formando coloração vermelho-groselha.

Centrifugar.

Em 10 minutos obtem-se o maximo de côr. A diluição final é de

$\frac{1}{5}$  Faz-se a leitura no colorimento.

Fiessinger e Walter dizem que a taxa de bilirrubina no plasma é 10 a 15% mais alta do que no sôro, devido á subtração determinada pela coagulação. (13).

Resumindo as observações da Clinica Varela Rubino, pôde-se dizer que nas ictericias agudas de evolução fria, a concentração da bilirrubina direta do sôro depende do grau de obstrução (extra ou intrahepatica) da via biliar de excreção; ela adquire seu mais alto grau nos neoplasmas com obstrução total do coledoco.

Pelo contrario, a concentração da bilirrubina indireta aparece subordinada a dois fatores principais.

a) Aumenta ou diminue paralelamente ás oscilações da ictericia.

b) Para um mesmo grau de ictericia (isto é, para um mesmo grau de bilirrubina direta, da qual depende a intensidade da ictericia nesses casos), a concentração da bilirrubina indireta parece estreitamente ligada ao grau de insuf. hepat. concomitante.

Os autores atribuem a essa insuficiencia, a concentração tão elevada nas ictericias catarrais.

E' no entanto muito baixa nas obstruções calculosas frias do coledoco, em que o parenquima hepatico conserva ainda suas funções normais. Mas neste ultimo caso quando a infecção se ajunta e por consequencia a hepatite, a bilirrubina indireta aumenta bruscamente.

Tenho duas observações de Santa Casa em que empreguei o metodo de Varela e Escuties.

O 1.º é um caso de cancer da cabeça do pancreas, diagnostico confirmado pela autopsia por mim assistida e feita pelo doutorando Taufic e verificada depois pelo Prof. Moisés.

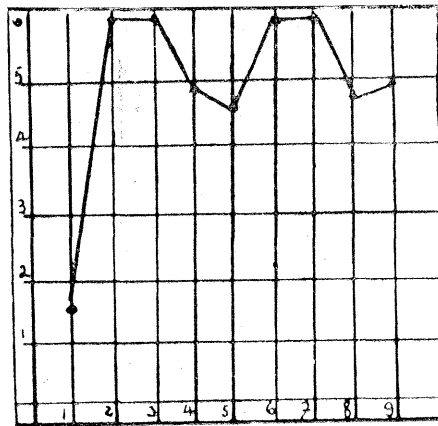
Contrariamente ao que se observa em geral, a obstrução não era completa. Antes da morte, o Dr. Leonidas Escobar isso fôra levado a afirmar pelo não descoramento das fezes.

E, "post mortem", comprimindo a vesícula biliar que se apresentava do tamanho de um ovo de avestruz, averigüei o esguicho de um filete de bilis.

Talvez por causa dessa obliteração incompleta se explique a razão porque não achei a bilirrubina direta tão elevada como acharam em um caso os autores uruguaiois.

No outro caso de cirrose atrofica, não encontrei B D e sim B I na proporção de 83 mgrs. %<sub>0</sub>.

Neste ultimo caso foi tambem executada a prova pela santonina (22) pelo Dr. Helmuth Weinmann. Acompanha um grafico correlato. Por ele se vê que o resultado confirma a expressão hepato-miopragica trazida pela hiperbilirrubinemia.



Curva da santonina. Cirrose atrofica

### Nota

O doente citado com cancer da cabeça do pancreas quando lhe extraí sangue em 15 de Março de 1933 estava recolhido á Enf. Cor. Manoel Py. Ocupava o leito 12 com papeleta n.º 1839. A bilirrubina direta atingiu a 83 mgrs. %<sub>0</sub> e a indireta a 22 mgrs. %.

A ultima paciente ainda se encontra (Junho 1934) na Enfermaria Com. Chaves Barcelos. Leito 29, papeleta 4071.

### Conclusões

1) As modificações de Tannhauser e Anderson, Weltmann e Jost, Collinson e Fawweather tornaram mais precisa e rigorosa a dosagem da bilirrubina hematica pelo processo de Van den Berg.

2) A tecnica de Varela e Esculies para dosagem da bilirrubina direta é precisa e simples.

3) A determinação da bilirrubina direta no sôro traz um subsidio precioso para o diagnostico diferencial nas ictericias, por exemplo, na-

queelas que são produzidas por calculo das vias biliares quando apireticas, e cancer da cabeça do pancreas.

Na primeira hipotese (calculo) a bilirrubina indirecta costuma estar normal ou abaixo da normal (5 mgrs. ‰). Ao passo que a directa está elevada.

Na segunda (cancer) a B. D. está elevadissima, mas a I. está tambem muito, pelo menos sempre mais do que nas coelitiasas frias.

Vê-se por esta simples consideração que valor não assume tal prova pela indicação operatoria dela resultante!

### Resumo:

O autor estuda os factores cromogenicos em a natureza. Acentua o papel do nucleo pirrolico, como base dos pigmentos organicos. Per "summa capita" analisa algumas provas de suficiencia hepatica. Menciona a coparticipação do dienecefalo e do sistema reticulo-endotelial sobre o funcionamento jecoral. Analisa succintamente o que ha de moderno sobre a bilirrubina, sobre as modificações da tecnica de Van den Berg. Examina o adminiculo conferido pela tecnica de Varela e Esculies para o diagnostico diferencial nas ictericias. Termina com a exposição rapida de observações pessoais.

### Bibliografia

- 1) *Polonowski et Lespagnol* — Chimie Org.-Biol. pg. 479.
- 2) *Barros Terra* — Chimica Org. Theor. pg. 491.
- 3) *Polonowski et Lespagnol*, loco citato, pg. 284.
- 4) *Varela Fuentes e Viana* — Arch. Urug. de Med., Cirurg. e Especial. Março 1934, pg. 211.
- 5) *Rondoni* — Chim. Fisiol. aplicada á Pat. e Clin., pg. 485.
- 6) *Enselme-Florence* — Prob. Ch., passim.
- 7) *Basabe (Horacio)* — Reação de Brugsch. Rev. Med. Lat. Am. Abril 1934, pg. 700.
- 8a) *Nägeli (Otto)* — Blutkrankheiten, pg. 94.
- 8b) *Lauda (Ernst)* — Physiologie der Milz, pg. 69.
- 9) *Varela (Manoel)* — Hematologia, pg. 187.
- 10) *Ferrata* — Tratado de Hematologia, Dirt. Ret. End.
- 11) *Póvoa (Hélion)* — Metabolismo — passim.
- 12) *Fraga (Clementino)* — Doenças do figado, pg. 97.
- 13) *Fiessinger e Walter* — Bilirubimétrie, "Nutrition", fasc. 3.º 1931, pg. 225.
- 14) *Dierick (J.)* — Trav. comp. monosacarides. Nutrition, Tome I, n.º 3, pg. 320 (1931).
- 15) *Moxó Queri (Diego)* — El prob. de la insuf. hepatica. La Clinica, Abril 1934, pg. 65.

- 16) *Walter (Henri)* — Retentions pigmentaires e chromagogues. Nutrition, "loco cit.", pg. 359.
- 17) *Chabrol et Busson* — Bilirubine de réserve, pg. 429 du "Paris Médical (19 Mai 1934).
- 18) *Krieger (Paulo)* — Reação de Van den Bergh. Tese 1927. Porto Alegre.
- 19) *Varela et Esculies* — Comptes Rendus, tomo 107, pg. 884. 1931.
- 20) *Piessinger e Walter*, "loco cit.", Nutrition, pg. 226.
- 21) *Varela e Viana* — C. Rendus, tomo 115 n.º 14 — 1934.
- 22) *Delgado Espinosa (Antonio)* — Contribución al Estudio dela Cromopexia en el Sist. Ret. End. Rev. Mexic. de Biol. tomo XIII, n.º 4. Out. 1933.
- 23) *Reuss, Peyton and Beard* — The characters of Kupfer cells living "in vitro" — 2) Selection with the magnet and cultivation of reticuloendotelial cells. The Journ. of. Exp. Med. Nal 59,