FERNANDO ORTIZ SCHNEIDER

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE
BIBLIOTECA

O METHODO DE CASTELLANI E TAYLOR NO DIAGNOSTICO DOS ASSUCARES URINARIOS

(Cadeira de Microbiologia)

TRABALHO FEITO NO INSTITUTO PEREIRA FILHO

THESE INAUGURAL

D
370
59m
27

A ESCOLA DE ENGENHARIA DE PORTO ALEGRE
— 1927 —

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

THESE

apresentada á

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

em 30 de Novembro de 1927

por

FERNANDO ORTIZ SCHNEIDER

Filho legitimo de Maximiliano Leopoldo Schneider
e de D. Izaltina Ortiz Schneider.
Nascido na cidade de Porto Alegre á 8 de Abril de 1903

AFIM DE OBTER O GRÁU DE DOUTOR EM MEDICINA

O methodo de Castellani e Taylor no diagnostico dos assucares urinarios

THESE INAUGURAL

OFFICINAS GRAPHICAS DA ESCOLA DE ENGENHARIA DE PORTO ALEGRE

1927

Bib.Fac.Med.UFRGS

T-0855

O metodo de Castellani e Taylo

S 359 o

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

Director: Prof. SARMENTO LEITE — Vice-Director: Prof. SERAPIÃO MARIANTE

Secretario: Prof. SARMENTO LEITE FILHO

DOCENCIA EM 1927

Cadeiras	*Professores*
Physica	Ney Cabral
Chimica geral e mineral	Christiano Fischer
Chimica organica e biologica	Christiano Fischer
Biologia geral e parasitologia	Sarmento Barata
Anatomia humana	Moysés Menezes
Anatomia descriptiva	Sarmento Leite
Histologia	Marques Pereira
Physiologia	Raul Pilla
Microbiologia	Pereira Filho
Clinica Medica Propedeutica	Thomaz Mariante
Clinica Cirurgica Propedeutica	Ervino Presser (interino)
Pathologia geral	Walter Castilho (docente livre)
Anatomia e physiologia pathologicas	Gonçalves Vianna
Pharmacologia e arte de formular	Argymiro Galvão
Pathologia cirurgica	Ervino Presser (interino)
Clinica ophtalmologica	Diogo Ferraz (interino)
Clinica dermatologica e syphiligraphica	Ulysses Nonohay
Clinica medica	Annes Dias (interino), Aurelio Py, Octavio de Souza
Clinica cirurgica	Guerra Blessmann, Frederico Falk
Anatomia medico-cirurgica e operações	Octacilio Rosa
Pathologia medica	Alberto de Souza
Therapeutica	Paula Esteves
Clinica pediatrica medica e hygiene infantil	Gonçalves Carneiro
Clinica pediatrica cirurgica e orthopedia	Nogueira Flores
Clinica oto-rhino-laryngologica	Diogo Ferraz (interino)
Hygiene	Freitas de Castro
Medicina legal	Annes Dias
Clinica obstetrica	Martim Gomes
Clinica gynecologica	Serapião Mariante
Obstetricia	Mario Totta
Clinica neurologica	Fabio Barros
Clinica psychiatrica	Luiz Guedes
Zoologia e parasitologia	Oscar Pereira (interino)
Botanica geral e systematica app. á pharmacia	Basil Sefton (interino)
Chimica analytica	Cunha Louzada (privativo)
Pharmacia galenica	Carlos Leite (interino)
Hygiene geral	Waldemar Castro (interino)
Bromatologia	Waldemar Castro (interino)
Toxicologia	J. D. Barbachan (interino)
Pharmacologia (segunda parte)	A. Galvão (interino)
Clinica odontologica	J. Paranhos
Prothese dentaria	Cirne Lima
Professores jubilados	Carvalho Freitas, J. Dias Campos, Freire Figueiredo e Velho Py
Professores honorarios	Carlos Barbosa, Olinto Oliveira e Protasio Alves
Professores em disponibilidade	Froés da Fonseca e Mario Bittencourt
Professor substituto da nona secção	Sarmento Leite Filho
,, ,, ,, decima quinta secção	Carlos Leite
,, ,, ,, decima sexta secção	Raul Moreira

NOTA: A Faculdade não approva nem reprova as opiniões emittidas nas théses pelos seus autores.

MED 05343294
T
WK870 S359m 1927

[0003318 24] Schneider, Fernando Ortiz. O methodo de Castellani e Taylor no diagnostico dos assucares urinarios. 1927. 65 p. : il.

PREFACIO

Apresentando este modesto trabalho á DOUTA CONGREGAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA, com o fim de obtermos o grão de «DOUTOR EM MEDICINA», não poderiamos fugir á praxe por todos seguida, de dizermos algumas palavras sobre sua importancia clinica e o criterio por nós observado para effectival-o.

A pesquiza dos assucares na urina, mórmente da glycose, deve ser considerada como de capital importancia, pois é, muitas vezes, no resultado desta pesquiza, que o medico vae buscar os dados para firmar o seu diagnostico, porque os symptomas clinicos não dispensam a confirmação laboratorial.

Quantos diagnosticos errados, quanta therapeutica mal aconselhada teriamos se os resultados colhidos pela pesquiza não exprimissem a verdade!

Assim sendo, é logico, é evidente que todo o tempo que dispendemos no presente trabalho, deve ser por nós considerado como muitissimo bem aproveitado, desde que, de qualquer forma contribua elle para evitar o que vimos de dizer.

Foi nosso pensamento, desde que o iniciamos, dar-lhe um cunho tanto mais pratico quanto possivel e, de

accordo com essa norma de conducta, dividimol-o em duas partes.

Na primeira, após algumas «Considerações geraes», e um estudo sobre o «Licor de Fehling, sua composição, reducções e reacções chimicas», procuramos analysar qualitativamente as «Substancias reductoras do licor de Fehling, existentes na urina», lançando mão de meios physicos e chimicos.

Terminamos a primeira parte com o «Processo microchimico para identificar alguns assucares Fehlingreductores encontrados na urina».

Visamos, nesta parte, não só tornar patente a difficuldade, em certos casos, de conseguirmos identificações precisas, como tambem as multiplas causas de interpretações erroneas que podem surgir.

Na segunda parte, estudamos, além dos processos myco-bacteriologico e bio-chimico de Castellani e Taylor, a modificação que o illustrado professor Pereira Filho propõe para o primeiro daquelles processos.

PRIMEIRA PARTE

Considerações geraes

A importancia clinica da identificação da glycose existente em certas urinas pathologicas, nos levou ao estudo do processo myco-bacteriologico de Castellani e Taylor, o qual, ao nosso vêr, tem sobre os processos commumente usados, a vantagem de uma facil identificação, não só desta substancia, como tambem de diversos outros assucares reductores, alguns com o mesmo poder dextrogyro daquella substancia.

Para reconhecimento e doseamento da glycose na urina, usam-se de processos chimicos, physicos e biologicos.

São empregados para o exame chimico diversos reactivos, e, entre elles, os de Trommer, Hager, Mulder, Rubner, Molisch, Fischer, Jaksch, Almen-Nylander e o de Fehling.

E' este, o licor cupro-potassico, o mais preferido, tendo, porém, este licor, a desvantagem de ser reduzido por substancias outras que não a glycose.

O acido urico e uratos, os conjugados glycuronicos, a creatinina e os saes ammoniacaes, se bem que não reduzam immediatamente o reactivo, o fazem após resfriamento.

Independente dos varios elementos já citados, medicamentos ha que egualmente reduzem, mais ou menos, o licor de Fehling, podendo-se, entre estes, citar

o bromoformio, o chloroformio, o chloral hydratado, o qual passa na urina em estado de acido urochloralico e desvia a luz polarizada para a esquerda. A essencia de therebentina, o oleo de copahyba, assim como a creatinina e o indoxylo, tambem reduzem o licor cupro-potassico, mas, são inactivos á luz polarizada.

Convém, porém, citar, que só a glycose reduz á frio o licor de Fehling, em volumes eguaes, após um contacto de vinte e quatro horas.

Afim de afastar as substancias que podem mascarar o resultado da investigação da glycose, deve ser a urina previamente defecada.

O defecante primitivamente empregado era o subacetado de chumbo liquido (extracto de Saturno), que tem a desvantagem de precipitar uma parte da glycose, quando a urina é neutra ou alcalina.

Por isso, prefere-se o reactivo de Courtonne, que é uma solução rigorosamente neutra de acetato neutro de chumbo.

Esse defecante, se não precipita o assucar e não exige a eliminação do excesso do reactivo, tem o inconveniente de não precipitar o acido urico e os derivados glycuronicos.

O defecante mais rigoroso, a que se deve recorrer nos casos duvidosos, são o de Patein e Dufau, que não só elimina as albumoses, as peptonas, o acido urico, como tambem a creatina e a creatinina.

Cada um delles tem, pois, a sua indicação especial, aconselhando a maioria dos urologistas, o emprego do licor de Courtonne, para, em seguida, verificada a acção reductora sobre o licor de Fehling, indagar-se das propriedades opticas e da formação de uma osazona caracteristica.

LICOR DE FEHLING

Sua composição, reducções e reacções chimicas

Os saes cupricos soluveis em solução tartrica alcalina, tratados por determinadas substancias, as oxydam, sendo elles proprios reduzidos ao estado de oxydo cuproso vermelho, que, pesado e crystalino, se precipita, emquanto que o sal cuprico, desapparecendo da solução, torna-a de azul que era, incolor.

Esta reducção, que se constata á frio para certos reductores como as hydrasinas e a hydroxylamina, se patenteia melhor á ebulição, e, nestas condições, os assucares aldehydicos e cetonicos, notadamente a glycose e a fructose, e, por conseguinte, sua mistura, são susceptiveis de serem pesquizados e dosados volumetricamente.

Se bem que os saes cupricos pudessem constituir um verdadeiro processo de pesquiza e dosagem de numerosas substancias, elles têm sido, até a presente data, applicados quasi que exclusivamente á pesquiza e dosagem dos assucares reductores.

Cabe á Vogel, a gloria de ter sido o introductor deste processo, successivamente estudado por Trommer, Barreswill, Schwartz, Fehling e Soxhlet, sendo estes dois ultimos auctores, os que melhor precisaram as condições de emprego do reactivo, afim de se conseguir resultados satisfactorios.

Numerosas são as formulas que têm sido indicadas para fornecer um licor cupropotassico inalteravel,

fórmulas essas, porém, que não têm correspondido ao fim desejado.

A maioria dellas se alteram sob a influencia dos raios solares directos ou mesmo á luz difusa.

Só se póde chegar ao fim desejado, isto é, á obtenção de um licor inalteravel, empregando-se duas soluções separadas, isoladamente inalteraveis.

Uma, a solução cuprica acidulada, outra, a tartrica alcalina.

A solução cuprica é preparada dissolvendo 35 grammas de sulfato de cobre crystallisado e puro em alguns centimetros cubicos dagua destillada, accrescentando-se, então, cinco centimetros cubicos de acido sulfurico puro e tanta agua destillada quanta fôr necessaria para completar mil centimetros cubicos.

A solução tartrica alcalina é preparada dissolvendo-se em cerca de quatrocentos centimetros cubicos dagua destillada, cento e cincoenta grammas de sal de Seignette, addicionando-se em seguida tresentos centimetros cubicos de lixivia de soda a trinta e seis gráos Baumé, completando-se, em seguida, com agua destillada, o volume de mil centimetros cubicos.

E' só no momento de emprego que se misturam, em partes eguaes, os dois licores, que nos fornecem, assim, um reactivo recente e sempre preciso.

Além do licor de Fehling, empregaram-se licores cupro-tartricos das formulas de Pasteur e Violette, os quaes possuem uma inalterabilidade relativa.

A fórmula de Pasteur é obtida fazendo dissolver separadamente, nagua destillada, cento e trinta grammas de soda caustica, cento e cinco grammas de acido tartrico, oitenta de potassa caustica e quarenta de sulfato de cobre puro e crystalizado.

Feitas as soluções, são ellas misturadas, completando-se um litro com agua destillada.

O reactivo de Violette é preparado dissolvendo-se trinta e seis grammas e quarenta e seis centigrammas de sulfato de cobre crystallizado e puro em cento e quarenta centimetros cubicos dagua destillada e duzentas grammas de sal de Seignette em quinhentos centimetros cubicos de lexivia de soda a vinte e quatro gráos Baumé.

A solução cuprica é derramada, pouco á pouco, agitando-se constantemente, sobre a solução tartrica, completando-se em seguida com agua destillada o volume de um litro.

Substancias reductoras do licor de Fehling, existentes na urina

GLYCOSE

LEVULOSE

MALTOSE

GALACTOSE

SUBSTANCIAS REDUCTORAS NÃO FERMENTESCIVEIS

DOS GRUPOS CREATININA, ACIDO URICO, ACIDO HIPPURICO, etc.

LACTOSE

PENTOSES

Glycose

Synonimos: Assucar do diabete, assucar de uva e dextrose

É, por certo, uma questão bastante difficil, a que diz respeito ao reconhecimento da glycose.

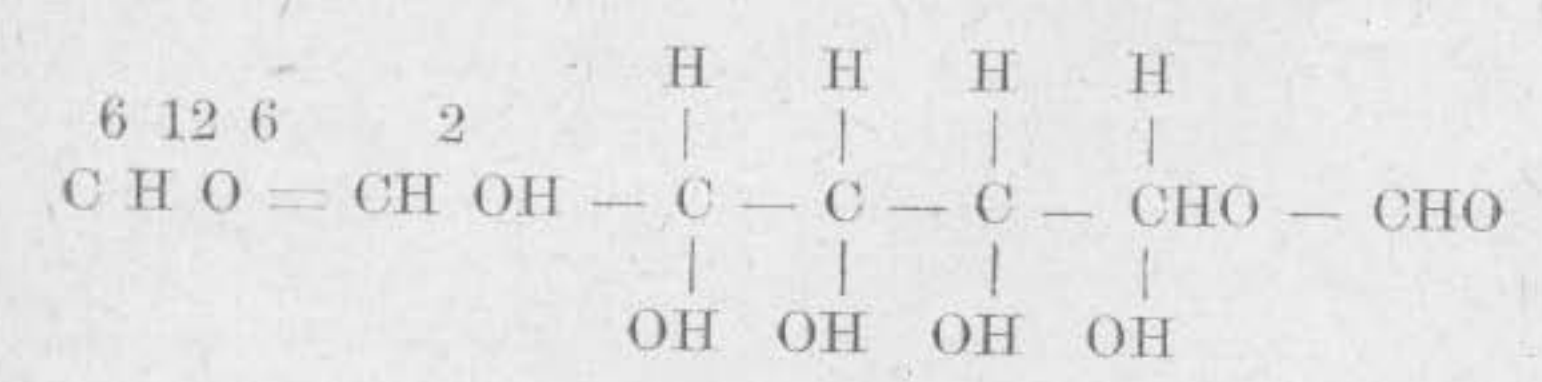
Enviada uma urina com o fim de se verificar se a mesma contem ou não aquelle assucar, torna-se em certos casos uma tarefa effectivamente difficil para o chimico, dizer se, de facto, a urina remettida é ou não portadora de glycose.

Para que fique bem patente esta difficuldade, passaremos em revista os meios de que o urologista se poderá servir, para a effectivação do trabalho que lhe foi requisitado.

Antes, porém, de encetarmos o estudo a que acima alludimos, diremos algo a respeito das propriedades physicas, chimicas e biologicas daquella substancia.

A glycose é encontrada, normalmente, em quasi todos os fructos assucarados e na economia animal, na maior parte dos tecidos e dos orgãos, na lympha, no sangue, no chylo e no conteúdo do intestino.

Sua fórmula chimica é:



E' uma hexose, cuja synthese foi obtida por Fischer, em 1890, apresentando uma funcção alcool primaria, quatro funcções alcooes secundarias e uma funcção aldehydo.

Esta substancia se apresenta, geralmente, sob a fórma de pequenos crystaes, agrupados em mamelões ou em couve-flôr.

Seu sabor é picante e farinaceo, tornando-se ligeiramente assucarado (tres vezes menos do que a saccharose).

E' soluvel nagua e no alcool, sendo que, no alcool absoluto, sua solubilidade fica muitissimo diminuida, tornando-se insoluvel no ether.

As soluções de glycoses dissolvem os oxydos de cal, baryta e cobre, combinando-se para dar glycosatos alteraveis ao ar e susceptivel de decomposição pelo calor.

Combinam-se ao chlorureto de sodio para dar um corpo crystallisado:

$$C^6 H^{12} O^6 NaCL H^2 O$$

o qual se fórma, frequentemente, pela evaporação dos liquidos que enceram glycose e chlorureto de sodio.

Crystallisavel, apresenta crystaes enfechando uma mollecula dagua ($C^6 H^{12} O^6 H^2 O$), desde que os crystaes provenham de uma solução aquosa; no caso, porém, de provirem de uma solução em alcool á 95°, são anhydros.

O poder rotatorio da glycose, que varia com a concentração, diminuindo gradualmente para tornar-se constante na concentração de cerca de 1 á $1\,^1/_2$ °/o.

Uma solução de glycose recentemente preparada,

sendo anhydra, apresenta, examinada ao polarimetro, um poder rotatorio approximado de $[a]_D = + 110°$.

Para o assucar secco, o poder rotatorio é de $[a]_D = + 52°$, sendo que á quente é observado com maior rapidez do que á frio.

Este phenomeno, dito de multirotação, Tanret explica dizendo que é devido a existencia de duas variedades de glycose a com poder reductor $[a]_D = 116°,6$ e a glycose γ $[a]_D = + 22°,5$, que se transformando uma na outra, dão, finalmente, uma mistura em equilibrio:

$$\beta\ [a]_D = + 52°$$

Devido a presença de uma funcção aldehydo, a glycose goza de poder reductor. Em virtude de sua constituição aldohydo-alcool, ella tem o poder de se combinar com a phenylhydrazina, em excesso, para dar uma osazona: a glycosazona.

A reacção se faz pela união da glycose á phenylhydrazina, dando eliminação de uma molecula d'agua a phenylhydrazona:

$$\underbrace{CH^2\,OH - (CHOH)^4 - COH}_{\text{GLYCOSE}} + \underbrace{AzH^2 - AzH - C^6\,H^5}_{\text{PHENYLHYDRAZINA}} =$$

$$= \underbrace{CH^2\,OH - (CHOH)^4 - CH = Az - AzH - C^6\,H^5}_{\text{PHENYLHYDRAZONA}} + H^2\,O$$

Unindo-se a phenylhydrazona á phenylhydrazina, em excesso, com eliminação de uma molecula d'agua e dois atomos de hydrogenio, dá a glycosazona:

$$\underbrace{CH^2\,OH - (CHOH)^4 - CH = Az - AzH - C^6\,H^5}_{\text{PHENYLHYRAZONA}} + \underbrace{AzH^2 - AzH - C^6\,H^5}_{\text{PHENYLHYDRAZINA}} =$$

$$CH^2OH - (CHOH)^3 - C - CH = Az - AzH - C^6H^5 + H^2 + H^2O$$
$$\overset{\prime\prime}{A}z - AzHC^6H^5$$
GLYCOSAZONA

A glycose é fermentada pelo fermento de cerveja, com producção de alcool e gaz carbonico:

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^2H^5OH + 2CO^2$$

O fermento lactico transforma a glycose em acido lactico:

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3$$

O fermento butyrico (bacillus amylobacter) a decompõe em acido butyrico:

$$C^6H^{12}O^6 = C^4H^8O^2 + 2CO^2 + 2H^2$$

Se nos apresenta como portadora de propriedades que nos interessam sobre maneira, e que são:

1.º — A de ser dextrogyra (propriedade physica).

2.º — a) de reduzir certos saes metallicos em presença de alcalis-causticos.

b) a de poder se combinar com a phenylhydrazina em excesso para dar a glycosazona. (Propriedades chimicas).

3.º — A de fermentar sob a acção do levedo de cerveja. (Propriedade biologica).

Analysemos cada uma destas propriedades:

A primeira, isto é, o seu poder dextrogyro, graças ao qual desvia o plano de polarisação da luz para a direita, é tambem peculiar, conforme sabemos, a

outras substancias, d'onde concluimos que, sómente por elle, não poderiamos dizer, com precisão, se o material em exame contém ou não glycose, pois se tal fizessemos, estariamos arriscados a cometter graves erros. Em virtude do que foi dito acima, dado como positivo o resultado da nossa pesquiza, quando elle o era realmente negativo, pois a luz poderia ter sido desviada para a direita, não devido á presença da glycose que suppomos não existir ahi, e sim devido á presença, no material em exame, de outras substancias com o mesmo desvio do plano de polarização, falho teria sido, assim, o resultado do nosso trabalho.

Pelo exposto, podemos dizer, com certeza de não incorrer em erro, que, se quizessemos basear a nossa pesquiza sómente no poder dextrogyro do liquido examinado, não poderiamos garantir, com precisão, a presença da glycose no material em exame.

Vejamos agora o que diz respeito ao poder que tem a glycose de reduzir certos saes metallicos em presença de alcalis-causticos.

O licor de Fehling, (solução cuprica) é o reactivo mais empregado para identificar aquella substancia.

De facto, este licor é por ella reduzido, mas devemos perguntar, se quizermos basear a nossa identificacão nesta reducção, si é sómente este composto hydrocarbonado que tem este poder reductor, ou si outras substancias encontradas na urina, tambem o possuem.

A resposta está justamente no inicio do presente capitulo, onde encontramos uma lista das substancias reductoras do licor cupropotassico.

Assim sendo, poderiamos concluir que, se procurassemos verificar a presença da glycose na urina, confiados nesta propriedade, nós, no caso de haver reducção, teriamos de pesquizar qual dos assucares Fehlingreductores foi o responsavel pelo resultado obtido e nunca dizermos que a reducção foi devido á presença, na urina em exame, da glycose, pois, assim como poderia ser essa substancia a-reductora, tambem poderia ser qualquer um dos outros assucares que gozassem de propriedade identica.

Está, portanto, excluida a hypothese de identificarmos a glycose com o auxilio unico e exclusivo desta sua propriedade chimica.

Somos, assim, chegados á propriedade biologica, com o auxilio da qual poderiamos tentar a identificação do assucar que, no momento, prende a nossa attenção e esta é a propriedade que tem a glycose de fermentar pela acção do levedo de cerveja.

E é ella a que resultados mais precisos nos póde fornecer e que, por si só, poderá identificar o assucar que estudamos, desde que, para isso, tenhamos o cuidado de escolher um levedo que goze da propriedade de sómente fermentar a glycose, produzindo gaz, sem que isso aconteça em presença de qualquer outra das substancias que podem ser encontradas na urina.

Se empregassemos o levedo commum, o nosso «desideratum» não seria conseguido, pois este, além de fermentar a glycose, tem identica acção em presença de outras substancias encontradas na urina, o que serviu de ponto de partida para Castellani e Taylor estabelecerem o seu «methodo mycologico de iden-

tificação de varios assucares e outros compostos hydrocarbonados existentes na urina.»

Além destes, outros meios poderiam ser empregados no intuito de identificarmos a glycose, meios esses que podemos chamar de mixtos e que serão relatados no capitulo que diz respeito ao methodo physico-chimico para identificar alguns assucares.

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

Meios chimicos

Processo de identificação pelo licor de Fehling

Colloca-se em um tubo de ensaio tres centimetros cubicos de licor cupropotassico e leva-se á ebulição durante alguns minutos. Faz-se isto para evitar que o licor de Fehling realize a sua propria reducção, o que acontece, desde que a sua preparação date de algum tempo.

Feita a operação acima, vamos accrescentar ao tubo tres centimetros cubicos de urina, portanto uma quantidade egual á do reactivo já existente no tubo.

Depois asseguramos a mistura dos dois liquidos, o que se consegue, agitando-se o tubo e levando-o novamente á ebulição.

No caso da mistura mudar de coloração, é signal de que a urina poderá conter assucar.

Quanto á coloração, poderá ser verde, amarella e passar ao alaranjado, vermelha ou ao castanho escuro.

Esta diversidade de coloração é devida á maior ou menor quantidade de assucar, e, sobretudo, á diversas substancias que a urina poderá conter.

A influencia destas substancias será tanto maior, quanto menor fôr a quantidade de assucar existente na urina.

Assim, quando uma urina contem uratos e acido oxalico, estes reduzem o reactivo lentamente, e isso se observa durante o resfriamento da mistura.

O inverso se passa com a creatina e a creatinina; estas, quando em grande quantidade, impedem a reducção do licor, desde que a quantidade de assucar existente na urina seja pequena.

Quando isto acontece, a mistura do reactivo com a urina apresenta uma coloração verde-escura, formando um precipitado que cahe, lentamente, no fundo do tubo.

Casos ha, em que a creatinina se combinando com o oxydo cuprico, provoca a descoloração da mistura que fica limpida, porém, após algum tempo, sua parte superior se tinge de vermelho e turva-se.

A observação da reducção é ainda difficultada pela presença da albumina que dá uma coloração violeta mais ou menos intensa.

Em presença dos saes ammoniacaes, quando em grande quantidade, nós observamos a mesma difficuldade: é isto devido ao deslocamento do ammoniaco por uma parte de soda, tornando o reactivo póbre em alcali-fixo.

Para obviar este inconveniente, é aconselhavel ferver, alguns instantes, a úrina em exame, com soda.

A alcaptona e os derivados glycuronicos podem mascarar o resultado da nossa pesquiza pelo facto de serem Fehlingreductores.

A differenciação seria conseguida, tendo-se em vista que a alcaptona não é precipitada pelos sub-acetato de chumbo e não tem acção sobre a luz polarizada e os derivados glycuronicos são precipitados pelo sub-acetato de chumbo e desviam para a esquerda o plano de polarização.

Conforme acabamos de vêr, muitas são as causas que, mascarando a nossa caracterização, poderiam

levar-nos á resultados completamente oppostos aos verdadeiros.

Como conseguir, pois, eliminar estas causa de erro?

Os urologistas são unanimes em aconselhar, como sendo o meio mais efficaz, a defecação da urina; mas, todos elles tambem dizem que, por este meio, conseguiremos afastar grande parte e nunca a totalidade das causas de erro. No emtanto, desde que tenhamos de fazer a identificação por este processo, devemos escolher qual o defecante a ser empregado.

O defecante classico é o sub-acetato de chumbo, que apresenta o grande inconveniente de, quando a urina fôr neutra ou alcalina, precipitar parte do assucar que ella contém, alem de precipitar tambem os conjugados glycuronicos em meio ammoniacal.

Vejamos, agóra, o reactivo de Courtonne que allia a vantagem de não precipitar o assucar á desvantagem de não precipitar o acido urico, derivados glycuronicos, peptonas, etc.

Em ultimo lugar, citamos o reactivo de Patein e Dufau, como sendo o mais rigoroso dos defecantes.

Este reactivo elimina as albumoses, o acido urico, a creatina e a creatinina; não precipita a glycose, mas, não arrasta o acido glycuronico e desdobra o conjugado glycuronico normal da urina.

Vejamos, agóra, a technica do emprego deste ultimo defecante:

A vinte e cinco centimetros cubicos de reactivo, addiccionam-se cincoenta centimetros cùbicos de urina e, nesta mistura, derrama-se soda, gotta á gotta, até que se obtenha reacção neutra verificada pelo papel de tournesol e, após, perfazer o total de cem centimetros cubicos com agua destillada, filtra-se.

O filtrado assim obtido se nos apresenta limpido, incolor e exempto de toda materia albuminoide, estando prompto para ser examinado ao polarimetro; mas, para a prova de reducção é improprio, porque ainda contém traços de mercurio que devem ser expurgados.

Para desembaraçal-o deste mercurio, devemos agitar, de vez em quando, durante duas ou tres horas, cincoenta centimetros cubicos deste filtrado addiccionados de duas grammas de pó de zinco.

Feito isto, devemos filtrar e juntar, ao oxydo de zinco precipitado, lixivia de soda com o fim de obter a sua redissolução.

Identificação pela potassa caustica

Em um vaso colloca-se vinte e cinco a trinta centimetros cubicos de urina para precipitar, collocando-se ahi, cinco ou seis pastilhas de potassa caustica, e, após a agitação do tubo para favorecer a dissolução, vamos obter um precipitado de phosphatos terrosos.

A parte superior é então sujeita á aquecimento depois de feita a sua passagem para um tubo de ensaio. Se a levarmos á ebulição e, segundo a quantidade de assucar nella contido, veremos o liquido em exame adquirir a coloração amarello escuro, castanho e castanho negro.

Identificação pelo processo de Böttger e Nylander

Dez centimetros cubicos de urina, addiccionados de um centimetro cubico de reactivo bismuthico, que se obtem dissolvendo duas grammas de sub-nitrato de bismutho e quatro grammas de sal de Seignette em cem centimetros cubicos dagua, accrescentando-se

depois dez grammas de soda caustica, são levados á ebulição.

Se tivermos a formação de um precipitado negro o qual é representado pelo bismutho reduzido, podemos concluir que a urina contém assucar.

Causas de interpretações e resultados erroneos, pódem surgir, quando a urina em exame contém albumina ou compostos sulfurosos, pois, apezar de se formar o precipitado negro, poderia ser responsavel por isto, não mais o bismutho reduzido, mas sim, o sulfureto negro de bismutho.

Identificação pelo processo de G. Ruini

Este processo tem sua origem na reacção baseada sobre a transformação do acido orthonitrophenylpropiolico $C^6 H^4 < \begin{matrix} C:C-CO^2H \\ Az0^2 \end{matrix}$ em indigotina.

Trinta centigrammas deste acido são dissolvidos em cem grammas dagua, conténdo seis grammas de soda pura.

Depois de se accrescentar á urina o presente reactivo, é a mistura resultante levada á ebulição e, depois de resfriada, agita-se-á com chloroformio. No caso de haver assucar, observar-se-á o apparecimento de uma coloração azul violeta.

A urina em exame deve ser préviamente defecada pelo reactivo mercurico, porque, se não tivermos este cuidado, substancias que ahi existam, taes como a creatinina e o acido glycuronico, poderão dar lugar á producção do indigo, acontecendo, portanto, o mesmo que com o assucar, o que nos levaria a uma erronea interpretação de resultado.

Identificação segundo Neubauer e Vogel

Utiliza-se para esta prova o nitrato de prata ammoniacal.

Identificação pelo methodo de Hager

Segundo este methodo, emprega-se como identificador o ferro-cyanureto de potassio.

Muitos outros meios chimicos de identificação da glycose poderiam ser por nós citados, mas, deixamos de fazel-o por julgarmos que os já citados são muito superiores a elles.

Meios physicos

Identificação pelo polarimetro

Sabemos que as vibrações da luz ordinaria se dirigem para todos os sentidos; ha, porém, certas substancias, taes como o «spath», que gozam da propriedade de fazer com que a luz que as atravessam, vibre num unico plano, perpendicular ao plano de incidencia e chamado plano de polarização.

Algumas substancias solidas e certos liquidos, gozam da propriedade de, uma vez interpostos na passagem da luz polarizada, desviar o seu plano de polarização.

Entre estas substancias, está incluida a glycose que desvia o plano de polarização para a direita, ao passo que a levulose o desvia para a esquerda.

E é baseado nas considerações acima, que se emprega o polarimetro para identificar a glycose.

Dentre os polarimetros, o mais empregado é o de Laurent, do qual daremos uma rapida descripção.

Compõe-se, elle, de:

1.º — um systema de lentes, destinado a tornar parallelos os raios fornecidos pela fonte luminosa;

2.º — uma lamina de bi-chromato de potassio ou uma cuba contendo este sal, destinada a reter os raios azues e violetas;

3.º — um polarizador de Nicol fornecedor da luz polarizada;

4.º — um diaphragma, sendo uma de suas metades recoberta por uma lamina de quartzo;

5.º — um tubo, como que ligando estas peças ao analysador, o qual é destinado a receber a substancia a examinar;

6.º — um Nicol analyzador, que vem após esse tubo e que é munido de um dispositivo para regular o funccionamento do apparelho;

7.º — uma luneta de Galileu, permittindo olhar o diaphragma.

A polarimetria pode ser considerada como sendo um methodo auxiliar do processo chimico, representado pela reducção do licor de Fehling.

E' elle empregado para, quando estivermos em presença de urina Fehlingreductora, sabermos se a reducção obtida é devida á glycose ou á levulose.

Sabendo que a glycose desvia o plano de polarização para a direita e a levulose para a esquerda, nós poderemos, segundo o desvio obtido, estabelecer qual dos dois assucares foi o responsavel pela reducção verificada.

Grimbert e Bernier, ampliam mais o emprego do polarimetro, como identificador da glycose, dizendo que, com o seu auxilio, se póde, algumas vezes, distinguil-a dos compostos glycuronicos levogyros que são encontrados em qualquer urina.

———....———

Levulose

A levulose ou da fructose é encontrada no mel e nas fructas, sendo representada pela seguinte formula chimica:

$$
\begin{array}{c}
CH^2\,OH \\
| \\
H.C.OH \\
| \\
H.C.OH \\
| \\
HO.C.H \\
| \\
CO \\
| \\
CH^2.\,OH
\end{array}
$$

No organismo é encontrada (tubo digestivo e sangue), provindo ou das fructas ingeridas ou do desdobramento da saccharose pelo fermento inversivo do intestino.

A levulose apparece raramente na urina porque ella é transformada e destruida mui rapida e facilmente.

A ingestão da levulose permitte prevenir e combater a eliminação do acido β oxybutyrico.

Seu sabor é mais assucarado do que o da glycose.

Seu poder rotatorio varia com a temperatura e a concentração.

Mais alteravel do que a glycose pela acção dos acidos e do calor, tem um poder maior de resistencia á acção dos alcalis e dos fermentos.

Os raios ultra-violeta emittidos por uma lampada de mercurio em quartzo, produzem sobre uma solução de levulose, uma degradação profunda da mollecula, indo, segundo Ranc, até a formação do formól, oxydo e anhydrido carbonico e alcool methylico.

O hydrogenio nascente a transforma em dois isomeros: a manita e a sorbita.

Oxydada, dá os acidos glycolico, paratartrico e trioxybutyrico.

Identificação da levulose

Toda vez que, examinada uma urina ao polarimetro, após previa defecação pelo sub-acetato de chumbo ammoniacal, observarmos o desvio do plano rotatorio para a esquerda, nós poderiamos pensar em responsabilisar a levulose por esse desvio.

Quando a dosagem da glycose pela reducção e pelo polarimetro não derem os mesmos resultados, poderemos concluir que a urina em exame seja portadora de levulose.

O que dissemos a respeito do desvio não deve ser feito, porque outras substancias podem existir na urina, cujo poder levogyro seja o verdadeiro responsavel pelo desvio do plano de polarização para a esquerda.

Estas substancias são os conjugados glycuronicos e o acido β oxybutyrico.

Como remover estas causas de erro?

Com relação ás combinações glycuronicas, é sufficiente submettel-as á acção do acetato de chumbo para que ellas precipitem, o que já foi feito.

Resta-nos, pois, sómente, temer que o desvio seja provocado pelo acido butyrico e, neste caso, teremos

de recorrer ao reactivo de Seliwanoff, afim de afastarmos a nossa duvida.

O reactivo de Seliwanoff é conseguido mediante a dissolução de duas grammas de resorcina em cem centimetros cubicos de agua destillada, juntando-se, depois, meio centimetro cubico de acido sulfurico puro.

A technica da reacção de Seliwanoff é a seguinte:

Em um tubo de ensaio contendo cinco centimetros cubicos de urina, são misturados cinco centimetros cubicos do reactivo de Seliwanoff á cinco centimetros cubico de acido chlorhydrico puro; leva-se ao banho-maria fervendo e deixa-se resfriar.

Se houver levulose, a urina se córa em vermelho carregado e, pelo resfriamento, fica turva.

O precipitado retido pelo filtro se dissolve no alcool, corando-o em vermelho escuro.

A formação deste precipitado ou turvação, é caracteristico da levulose.

Para realisar a reacção de Seliwanoff, deve-se sempre defecar a urina com o auxilio do acetato de chumbo e nunca com o reactivo de Patein e Dufau, que viria falsear o resultado, devido a introducção de azotatos.

Segundo R. e O. Adler, os nitritos formados pela reducção dos nitratos, devido a acção das bacterias e observados em certas urinas, poderiam constituir uma causa de erro.

M. Grimbert afasta este obstaculo, dizendo que a coloração produzida pelos nitritos, em presença do reactivo de Seliwanoff, é attenuada pelo aquecimento.

———

Maltose

$$C^{12} H^{22} O^{11}$$

Os acidos diluidos, a saliva, a invertina do levedo e a do succo intestinal, a desdobram por hydrolyse em duas molleculas de glycose:

$$C^{12} H^{22} O^{11} + H^{2} O = 2C^{6} H^{12} O^{6}$$

Apresentando sob o ponto de vista qualitativo reacções identicas ás da glycose, pois são ambas dextrogyras, reductoras e fermentesciveis, a maltose torna-se, até certo ponto, de difficil caracterisação.

De facto, se estivermos em presença de uma urina Fehlingreductora e que desvie o plano de polarisação para a direita, precisamos saber qual dos dois assucares é o responsavel por isso.

Para solucionarmos o que acabamos de dizer, teremos de examinar o poder dextrogyro e reductor de ambas as substancias, afim de encontrarmos os meios para o diagnostico differencial.

A maltose, desde que seja anhydra, apresenta um podor rotatorio $[\alpha]_D = + 114^{o}$.

Se fizermos com que ella ferva com acido mineral diluido, para obtermos seu desdobramento em duas molleculas de glycose com fixação dagua, teremos:

$$C^{12} (H^{2} O)^{11} + H^{2} O = C^{6} (H^{2} O)^{6} + C^{6} (H^{2} O)^{6}$$

342 grms. + 18 grms. = 180 grms. + 180 grms.

Si 342 grammas de maltose fornecem 360 grammas de glycose, é claro que 100 grammas fornecerão 105 grammas e 26 centigrammas, considerando que o poder rotatorio da glycose é de +52°,6 e que o da obtida após o desdobramento da maltose é de +53°,8, poderemos concluir que, após ser submettida á ebulição, a solução de maltose com acido mineral diluido, apresentará seu poder dextrogyro diminuido na proporção de 114 para 52°,8.

O poder reductor da maltose é egual á 66, desde que se considere egual a 100, o da glycose.

Submettendo-se a maltose, em presença de acidos mineraes diluidos, á ebulição, vamos notar que o seu poder reductor é elevado quasi ao dobro.

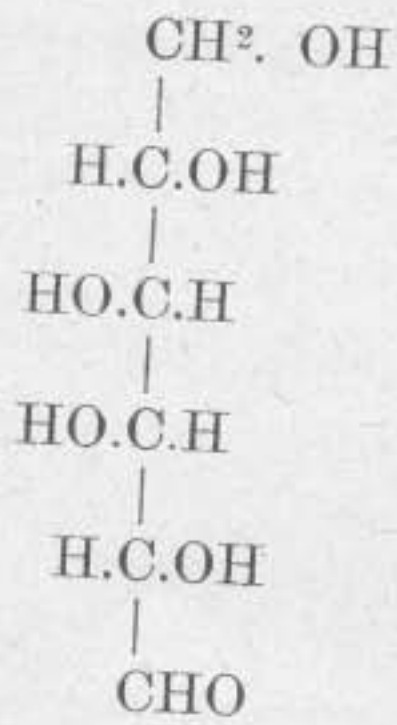
Baseado nestas duas propriedades, podemos estabelecer o diagnostico differencial entre a glycose e a maltose, da seguinte maneira:

Sempre que o poder rotatorio e reductor da urina em exame não forem modificados depois de ter sido levada á ebulição em presença de um acido mineral diluido, podemos concluir que o material em exame contém glycose; si, porém, observarmos a diminuição do poder rotatorio na proporção de 114 para 53°,8 e o poder reductor augmentado na proporção de 1 para 2, podemos dizer que a urina examinada é portadora de maltose.

Poderiamos, ainda, identificar a maltose por meio da Phenylhydrazina, mas, nos reservamos para fazel-o opportunamente.

———

Galactose



Fórma-se pela hydrolyse do agar-agar, das materias pepticas, muscillaginosas e de algumas galactocerebrosides. Oxydada a galactose, dá o acido mucico.

A galactose é um dissaccharide proveniente da hydrolyse da lactose que se desdobra em glycose e galactose, sob a acção dos acidos mineraes diluidos ou de certas diastáses:

$$C^{12} H^{22} O^{11} + H^2 O = C^6 H^{12} O^6 + C^6 H^{12} O^6$$

E' soluvel na agua, pouco soluvel no alcool forte, muito pouco soluvel no alcool absoluto e insoluvel no ether.

Goza da propriedade de desviar para a direita o plano da luz polarizada, sendo, portanto, dextregyra e apresentando o poder rotatorio especifico de:

$$[a]_D = + 83^o$$

Reduz o licor de Fehling, e esse seu poder reductor póde ser comparado á 93, desde que se considere o da glycose egual á 100.

Fermenta pelo levedo de cerveja, com producção de alcool e gaz carbonico. Esta fermentação, porém, deve ser tentada utilizando-se levedo que, graças a uma adaptação progressiva, se tem habituado a viver em meios galactosados, pois se não tomassemos esta precaução, estariamos sujeitos a não conseguir o resultado almejado.

Lactose

Synonymo: Assucar do leite.

Diversos micro-organismos a transformam em acido lactico:

$$C^{12} H^{22} O^{11} + H^2 O = 4C^3 H^6 O^3$$

Encontrada quasi que exclusivamente no leite dos mammiferos, sendo o leite da mulher o que apresenta maior percentagem (na proporção mais ou menos de 7 %), a lactose resulta da combinação da glycose com a galactose.

E' reductora do licor de Fehling, sem que para isso necessite de intervenção previa, mas, o seu poder reductor é inferior ao da glycose.

Desvia para a direita o plano de polarização da luz, variando esse desvio com a temperatura, sendo este desvio representado para a lactose anhydra, segundo Grimbert, por:

$$[\alpha]_D = 55^o,30 + (20 - t^o)0,055$$

Poder rotatorio este, que se torna mais elevado nos primeiros momentos da dissolução, acontecendo, portanto, o mesmo que com a glycose.

E' insoluvel no alcool e no ether, soluvel nagua fria e muito mais em agua quente, onde attinge a percentagem de 50 %.

Aquecida á 87°, a lactose se amollece, perdendo a agua á 110° e fundindo-se á 203°.

Em presença do levedo, não fermenta; porém, certos levedos especiaes os eschyzomycetos, produzem a fermentação alcoolica da lactose, após desdobramento em galactose e glycose, graças á acção da lactosefermento por ellas secretado.

Identificação pelo prosesso de Worm-Müller

Baseado na propriedade que essa substancia tem de não fermentar directamente pela acção do levedo de cerveja, a urina é collocada em presença do levedo durante dois dias.

No fim deste tempo, é a urina filtrada, em seguida tenta-se com o filtrado obtido, a reducção do licor cupro-potassico, e si esta fôr conseguida, o licor em exame deve ser considerado como portador de lactose.

Identificação pela reação de Rubner

Tres grammas de acetato de chumbo são dissolvidas em dez centimetros cubicos de urina, filtra-se e leva-se á ebulição, derramando-se então, gotta á gotta, ammoniaco.

Si houver lactose, apparecerá uma coloração amarella que muda para o alaranjado e depois para o vermelho tijolo.

Esta reacção, se fosse especifica da lactose, teria muito valor, pois até 0,02 % desta substancia, daria lugar a um resultado positivo; mas, não podemos consideral-a como especifica, porque a maior parte dos assucares Fehlingreductores dão, em presença do acetato de chumbo e do ammoniaco, uma coloração vermelha que é susceptivel de ser confundida com a que fornece a glycose.

O processo mais seguro para identifical-a é o da phenylhydrazina, do qual em tempo nos occuparemos.

Pentoses

Têm por fórmula chimica: $C^6 H^{10} O^5$.

Reduzem o licor de Fehling, mas, quando têm como vehiculo a urina, a reducção não é nitida e lembra a obtida, quando em presença de urinas ricas em creatininas.

Dão, com a phenylhydrazina, osazonas caracteristicas.

Não fermenta em presença do levedo da cerveja.

Identificação pela phloroglucina

Celloca-se em um tubo de ensaio cinco centimetros cubicos do urina, cinco centimetros cubicos de acido chlrhydrico puro e duas ou tres centigrammas de phloroglucina.

No caso da urina conter pentoses, vê-se, pelo aquecimento brando, apparecer uma coloração vermelha.

Agitando-se o conteudo do tubo com alcool amylico, após o resfriamento, observa-se o apparecimento de uma coloração vermelha e, examinando-se ao espectroscopio, se verá uma faixa de absorpção entre as raias D e E.

Esta prova tem, sobre a precedente, a vantagem de não se poder confundir a sua coloração com a dada pelas côres escatolicas, o que acontece quando a coloração vermelha fornecida pela phloroglucina é fraca.

Identificação pela orcina, segundo Manfred Bial

Leva-se á ebulição cinco centimetros cubicos de um reactivo conseguido pela dissolução de uma gramma de orcina pura, em quinhentos centimetros cubicos de acido chlorhydrico fumegante, ao qual se juntam vinte e cinco gottas d'uma solução contendo vinte e nove por cento de perchlorureto de ferro anhydro. Retira-se do fogo e addicciona-se, em seguida, cinco gottas de urina (sómente cinco gottas, afim de não resfriar), se a urina contem pentoses, produz-se uma coloração verde.

Identificação pela reacção do Furfurol

Leva-se á ebulição um tubo contendo partes eguaes de urina e acido chlorhydrico.

Se na urina existir pentoses, notaremos o desprendimento de vapores de furfurol que vão corar em vermelho purpura um papel impregnado de acetato de anilina, que se consegue saturando o oleo de anilina pelo acido acetico á 50 °/₀.

Nenhuma das reacções que acabamos de citar, é sufficiente para identificar as pentoses, pois as propriedades sobre as quaes nos baseamos, não pertencem exclusivamente ás pentoses e são tambem communs á outras substancias que pódem ser encontradas na urina.

Processo micro-chimico para identificar alguns assucares fehlingreductores encontrados na urina

E', ao nosso vêr, o processo que melhor resultado nos póde offerecer, desde que a questão seja encarada sómente sob o ponto de vista physico-chimico. Basea-se na propriedade que têm alguns assucares de se combinarem com a phenylhydrazina, dando como resultado uma *osazona*, que, segundo o assucar de que provem é denominada glycosazona, maltosazona. etc.

Resalvando-se, porém, a osazona da levulose que é impropriamente denominada glycosazona.

Apezar de ambas as osazonas, provenientes da glycose e da levulose, apresentarem a mesma temperatura de fuzão, o mesmo aspecto quando examinadas ao microscopio e, portanto, propriedades identicas, não é justo que sejam ambas denominadas de glycosazonas, cabendo, com muita razão, o nome de levulosazona, á osazona oriunda da levulose, reservando-se o de glycosazona para a proveniente da glycose.

Sendo a glycosazona e a levulosazona tão semelhantes, é logico que se conclua que caracterisal-as pelo processo que ora estudamos, seja bastante difficil, senão impossivel, pois, ante uma osazona que apresente propriedades e aspecto communs ás duas,

nós não poderemos precisar si se trata de uma levulosazona ou glycosazona; ou, em outros termos, si a osazona é proveniente da glycose ou da levulose que a urina possa conter.

Glycosazona

A identificação da glycose pelo processo microchimico, tem o seu valor, não só quando quizermos obter a confirmação de resultados positivos conseguidos pela reducção e pelo desvio polarimetrico, como no caso de não conseguirmos uma reducção que paire acima de qualquer suspeita e de um desvio que esteja fóra de toda duvida.

Conforme sabemos, a glycose se combinando com a phenylhydrazina, dá como resultado uma substancia crystalisada: a glycosazona, que é obtida da seguinte maneira, devendo a reacção ser feita á quente e em meio acetico:

> «Em um tubo de ensaio, contendo vinte e «cinco centimetros cubicos da urina a examinar-«se, já defecada com o auxilio de reactivo de «Patein, junta-se um centimetro cubico de phe-«nylhydrazina, um e meio centimetro cubico de «acido acetico crystalisavel e meia gramma, «approximadamente, de acetato de sodio crys-«talisavel, que corresponde a mais ou menos tres «centimetros cubicos da solução á vinte por «cento; após assegurar-se a mistura, agitando «o tubo, submette-se este ao calor do banho-«maria durante uma hora.

Da operação que acabamos de descrever, resulta a formação de um precipitado flocoso de coloração amarella.

No caso de ser a glycose, o assucar responsavel pela formação do deposito amarello, nós observaremos, desde que este precipitado seja examinado ao microscopio, que elle é constituido por finas e longas agulhas amarellas, reunidas em grupos que lembram ramos de giesteiro.

Vezes ha, porém, em que, ao contrario de agulhas longas, o miscroscopio nos revela a presença de agulhas curtas, o que traduz a pobreza de glycose na urina em exame. Segundo a opinião de Grimbert, a phenylglycosazona póde ser obtida á quente, desde que a taxa de glycose existente na urina seja superior á 65 centigrammas por litro; no caso da taxa não attingir a esta porcentagem, a phenylglycosazona sómente poderá ser obtida pelo resfriamento.

Desde que a urina addicionada de phenylhydrazina e previamente neutralisada, tenha sido defecada pelo reativo de Patein, desnecessario se torna desembaraçal-a dos traços de mercurio que por ventura possa conter, porque disso se encarregará a propria phenylhydrazina.

Segundo ainda Grimbert, no caso da urina apresentar traços de mercurio, devemos deitar algumas gottas de phenylhydrazina, observando-se então, a formação de um precipitado negro, o qual deve ser separado por filtração, sendo que a parte que passou pelo filtro deve ser tratada do modo já referido.

Casos ha, porém, em que, si bem que tenhamos seguido todos os preceitos da technica, a glycosazona obtida não apresenta crystaes caracteristicos.

Neste caso, Bernier, aconselha a seguinte technica:

«Defecar a urina com o auxilio do reactivo

«nitro-mercurico, neutralisal-a em seguida, elimi-
«nar o mercurio e obter a osazona empregando-
«se, os menos, cincoenta a cem centimetros cu-
«bicos de liquido.

«Levar o tubo ao banho-maria durante tres
«quartos de hora e deixar que o resfriamento
«se processe lentamente.

«Examinar ao microscopio os crystaes for-
«mados, o apparecimento de grandes crystaes
«amarello-ouro, dispostos em roseta, constituirão
«já, um sério indicio de glycosazona.

«A saccharose não intervem, sensivelmente,
«na reacção.

«Recolher o producto sobre o filtro, laval-o
«nagua, seccal-o no vacuo sulfurico e tratal-o
«pela benzina.

«A osazona seccada rapidamente, apresen-
«tará um ponto de fusão de 135 á 137°, appro-
«ximadamente, si ella fôr constituida pela gly-
«curosazona quasi pura; ao passo que essa tem-
«peratura será ultrapassada, se o producto con-
«tiver glycosazona e a temperatura será tanto
«mais alta, quanta maior fôr a quantidade con-
«tida.

«Si tivermos que caracterisar esta glycosa-
«zona, é sufficiente tratar o producto por uma
«pequena quantidade dagua em um tubo de en-
«saio, ao banho-maria fervendo.

«O residuo insoluvel, recolhido e seccado,
«fundirá de 228 á 230°.»

Levulosazona

Tudo, ou quasi tudo, do que acabamos de dizer com relação á glycosazona, poderiamos repetir aqui.

Nada mais facil, nada mais simples, do que identificarmos ao sazona proveniente da glycose ou da levulose em presença das osazonas obtidas de outros assucares; mas, difficil, difficilimo mesmo, é fazer-se o diagnostico differencial pelo presente methodo, entre a glycosazona e a levulosazona.

Julgamos fóra de duvida que, sómente por meio de exame micro-chimico, não conseguiriamos estabelecer a differenciação, dada a propriedade que tem a osazona proveniente de qualquer um desses dois assucares, de se apresentar sob o mesmo aspecto quando examinada ao microscopio.

Poderiamos tentar affastar esta difficuldade, procurando determinar a temperatura de fuzão de cada uma das osazonas obtidas.

A nossa tentativa, porém, não nos traria o resultado almejado, pelo facto de ambas fundirem na mesma temperatura.

Como sendo um meio que julgamos poder auxiliarnos em caso de duvida, citámos o seguinte:

Toda vez que pesquizarmos uma osazona, devemos, antes de fazel-o, sujeitar o liquido á prova polarimetrica, para verificarmos se o plano de polarização é desviado para a esquerda ou para a direita, afim

de, no caso de obtermos uma osazona com os caractéres communs á glycosazona e á levulosazona, podermos concluir se isso aconteceu devido á presença da glycose ou da levulose, tendo em vista que a glycose é dextrogyra, emquanto que a levulose é levrogyra.

Casos ha em que a prova polarimetrica não póde ser constatada e assim, voltaremos ao principio, isto é, de nada adiantou o nosso trabalho.

Maltosazona

Quando, pelo exame microscopico de um precipitado, após resfriamento completo, proveniente de uma urina tratada pela phenylhydrazina, segundo a technica já mencionada, observarmos a presença de grandes laminas quasi rectangulares, tanto mais largas quanto mais rico em maltose fôr o liquido, na maioria dos casos agrupadas concentricamente, poderemos concluir que isto se dá, graças á presença da maltose na urina em exame.

Grimbert aconselha, para caracterisar pequena quantidade de maltose em presença da glycose, o seguinte processo:

> «A mistura das osazonas, obtida após a acção «da phenylhydrazina acetica ao banho-maria fer«vendo durante uma hora, seguida de completo «resfriamento, é filtrada, lavada pela agua fria, «seccada, e depois lavada ao benzeno, até que «cesse de passar colorido e, emfim, novamente «seccada.
>
> «O producto assim purificado é diluido em pe«quena quantidade d'agua e aquecido ao banho«maria fervendo, durante cinco minutos e depois «rapidamente filtrado.
>
> «O liquido filtrado abandona, pelo resfriamen«to, crystaes de maltosazona.»

A maltosazona funde entre 196° e 198°. —.

Pelos caractéres ja expostos, facil será identificarmos a maltosazona, mesmo quando em companhia de outras osazonas.

Galactosazona

Si, logo após ao banho-maria fervendo, a que foi sujeito o material em exame, e, segundo a technica da identificação pela phenylhydrazina, fôr examinado ao microscopio, revelando ahi, a presença de grandes folhas lanceoladas, agrupadas concentricamente e de colloração amarella, devemos concluir que se trata de crystaes de galactosazona, o que equivale a dizer que o material em exame é portador de galactose.

A galactosazona funde á 214°.

Para determinarmos sua temperatura de fusão, devemos tomar certas precauções, porque a presente osazona, como todas as outras, se decompõe facilmente na proximidade do respectivo ponto de fusão.

Consegue-se impedir esta decomposição, empregando-se a technica seguinte:

A substancia, depois de bem secca e pulverisada, é collocada sobre o blóco de Maquenne.

Se a temperatura do blóco fôr a da fusão, a substancia funde-se instantaneamente. Si não acontecer o que acabamos de dizer, eleva-se lentamente a temperatura do blóco, ao mesmo tempo que se vae lançando sobre elle algumas parcellas da substancia, cujo gráo de fusão se deseja conseguir.

A temperatura mais baixa, capaz de fundir instantaneamente a substancia em estudo, é a que representa o seu gráo de fusão.

Em virtude do que acabamos de dizer, facil será differençar a galactosazona das demais osazonas, que, porventura, possam existir na urina.

Lactosazona

Os crystaes de lactosazona, vistos através do microscopio, apresentam uma fórma de rim radiado, de castanhas e de espheroides radiados, envolvidos por um filamento flexuoso, sendo que a coloração de todos é amarella.

A technica para a obtenção da lactosazona deve ser, segundo Grimbert, a seguinte:

«Após a defecação da urina, pelo reactivo de «Patein e Dufau, e eliminação dos ultimos traços «de mercurio pelo zinco, junta-se a phenylhy- «drazina, o acido acetico e o acetato de sodio, «do mesmo modo que com a glycose; feito isto, «é o todo levado ao banho-maria fervendo, du- «rante uma hora.

«Si se formar á quente um precipitado de gly- «cosazona, deve-se filtrar o liquido quando ainda «quente, e deixal-o resfriar-se, sendo a lactosa- «zona precipitada por este resfriamento.

«Devemos, então, recolhel-a sobre um filtro e «laval-a n'agua fria, tratando-se em seguida, no «proprio filtro, por um pequeno volume da mistura, «em partes eguaes, de acetona e agua, que dis- «solve unicamente a lactosazona.

«Evaporando-se a acetona, deixa como residuo «a lactosazona crystallisada.

«Si os crystaes assim obtidos não forem cara- «cteristicos, deve-se, então, transvasar o producto

«da evaporação para um tubo de ensaio o qual «é levado ao banho-maria, após ter-se incorpo- «rado ao conteúdo do tubo algumas gottas dagua, «conseguindo-se, como resultado, disssolução da «lactosazona.

«Si fôr preciso, filtramos uma segunda vez dei- «xando-se a cystalização se processar pelo res- «friamento, obtendo d'esta fórma crystaes caracte- «risticos que fundem de 213 á 215º, sobre o «bloco de Maquenne,»

Na urina existem, normalmente, derivados glycuronicos que o reactivo de Patein hydrolysa parcialmente.

Devido a isso, torna-se mistér que tomemos precauções, afim de evitarmos a confusão entre a lactosazona e glycurosazona, pois ambas têm a propriedade de se dissolverem n'agua quente e na acetona diluida.

O meio de evitarmos tal confusão é representado pela determinação dos gráos de fusão de cada uma dellas pelo processo de Bertrand.

Por este methodo, a lactosazona funde de 213 á 215º e a glycurosazona de 134 á 137º.

SEGUNDA PARTE

Origem do processo myco-bacteriologico de Castellani e Taylor

A difficuldade em diagnosticar a presença da glycose e a opinião quasi unanime dos tratados de biologia e clinica, de que o meio mais seguro de fazel-o, é representado pela prova do levedo, foi que attrahiu a attenção de Castellani para este assumpto, iniciando seus estudos em 1904, publicou mais tarde, em companhia de Taylor, differentes trabalhos a este respeito.

Estes auctores, verificando que a maioria dos laboratorios de pathologia empregavam o levedo de padeiro com o intuito de identificar a presença da glycose na urina, resolveram colher oito amostras de levedo em diversas padarias de Londres, para constatar si sómente a glycose era por elle fermentada, tendo obtido os seguintes resultados:

Amostra 1: Introduzida directamente em agua peptonada com assucar, fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose, galactose, saccharose, dextrina, lactose, adonitol, inulina, sorbita, dulcitol, manitol, rafinose, arabinose, salicilina, amigdalina, isodulcitol, eritrita e glycerina.

Amostra 2: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, lactose, maltose e saccharose.

Amostra 3: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose, e galactose; produziu acido, mas não gaz em presença da lactose.

Amostra 4: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose, galactose, saccharose, lactose, inulina e dextrina.

Amostra 4: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose e maltose.

Amostra 6: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose e galactose.

Amostra 7: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose, galactose, saccharose e lactose.

Amostra 8: Fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, maltose, galactose, saccharose, dextrina, lactose, adonitol, inulina, sorbita, dulcitol, manitol, rafinose, arabinose, salicilina, amigdalina, isodulcitol, eritrita e glycerina.

Em face destas experiencias, é logico que o levedo commum não se presta para identificar a glycose, pois conforme vimos, além della, muitas são as substancias por elle fermentadas.

Levando avante suas experimencias, tendo em vista o facto do levedo das padarias ser quasi sempre impuro, pois contém uma ou duas especies de saccharomycetos, além de um bacilo Gram positivo, que na maioria dos casos é nelle encontrado, resolveram, os dois auctores, effectivar as mesmas experimencias,

empregando, em logar de levedo commum, tres culturas puras de levedo procedentes de laboratorios idoneos.

Os resultados conseguidos com as tres culturas, foram os seguintes:

A primeira: fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, galactose e saccharose.

A segunda: fermentou produzindo gaz a glycose, levulose, galactose, saccharose e maltose.

A terceira: apresentou os mesmos resultados que a segunda.

D'onde se conclue que, embora empregando culturas puras de levedo, não chegariamos a resultados seguros, ante os quaes pudessemos identificar a glycose, pois, a fermentação conforme vimos, não só é produzida em sua presença, como tambem na de outros assucares.

Tornava-se mistér, portanto, para identificar aquella substancia, encontrar-se um germe que gozasse da propriedade de fermentar produzindo gaz, unicamente a glycose, ou melhor, que lhe fosse especifico.

Esta propriedade é apanagio de muito poucos germes, porque a maioria dos que a possuem para a glycose, extendem-na não só á levulose, como tambem á outros assucares e hydratos de carbono.

Entre os poucos que sómente fermentam a glycose com producção de gaz, está incluida a *monilia balckanica*, que foi descoberta por Castellani.

Novas tentativas foram feitas como o fim de descobrir se era possivel obter, para cada um dos assucares, microbios que tivessem, em presença de cada um delles, procedimento identico ao da *monilia*

balckanica em face da glycose. Estas pesquizas não deram o resultado almejado, porém, foi baseado nellas, que Castellani e Taylor estabeleceram o seu «methodo myco-bacteriologico, para identificação de algumas substancias Fehlingreductoras», onde, conforme veremos, em virtude de não conseguirem microbios especificos para substancias que não a glycose, o diagnostico é feito por exclusão.

Processo myco-bacteriologico de Castellani e Taylor para identificar alguns assucares Fehlingreductores

Indo buscar as bases para o presente processo em diversas provas que consistiam em addicionar á urina, diversos assucares e hydratos do carbono, para depois identifical-os por meio de diversos microbios, dos quaes opportunamente nos occuparemos, Castellani e Taylor aconselham os seguintes cuidados para conseguirmos o fim collimado:

Verificado se a urina é Fehlingreductora proceder-se-á:

I) A esterelisação: — A esterelisação, se a urina não foi colhida asepticamente, póde ser feita, tanto pelo calor como pela filtração.

a) pelo calor: — colloca-se a urina á examinar nos tubos em que se vae realizar a identificação, e se os aquece durante trinta minutos em um apparelho de Koch; muitas vezes, um unico aquecimento durante trinta minutos é sufficiente, porém, deve-se, em certos casos, aquecel-a duas ou tres vezes.

A esterelisação nunca deve ser feita por meio do autoclave, porque, este póde alterar, não só a natureza do assucar, como tambem a dos outros carbohydratos.

b) pela filtração: — para se esterelisar a urina por meio da filtração, faz-se com que ella passe através de um filtro de Berkefeld ou de Chamberland.

II) Enriquecimento do meio: — deve-se enriquecer o meio addicionando-se á urina em exame, um terço ou igual quantidade de agua peptonada, não só para que melhor se desenvolvam os germes, como tambem para favorecer um maior desprendimento de gaz.

III) Technica: — 6 tubos contendo urina tratada nas condições acima e contendo cada um delles um tubo de fermentação de Durham são por nós denominados de tubos um, dois, tres, quatro, cinco e seis.

A) semeadura: — procede-se em seguida a inoculação, segundo a ordem seguinte:

Tubo 1: *monilia balckanica, Castellani.*
Tubo 2: *monilia Krusei Castellani.*
Tubo 3: *monilia Pionyi Castellani.*
Tubo 4: *monilia Metalondinensis Castellani.*
Tubo 5: *bacillus Coli-communis Escherich.*
Tubo 6: *bacillus para-typhosus B. Schottmüller.*

Monilia Balckanica Castellani, 1916

Foi encontrada no escarro e em um caso de dermatite, da qual ella não podia ser a causa.

Fermenta produzindo gaz sómente a glycose.

Monilia Krusei Castellani, 1909

Synonymos: Saccharomyces Krusei, Castellani e Endomyces Krusei Castellani.

Foi encontrada no catharro, por Castellani.

Assemelhando-se a um saccharomyces quando nas expectorações e apresentando todos os caractéres de um saccharomyces quando em inicio de cultura, percebendo-se, após algumas gerações, um pequeno mycelio quando cultivada em meio de Sabouraud.

Com a glycose e a levulose, fermenta produzindo gaz.

Monilia Pinoyi Castellani, 1910

Synonymo: Endomyces Pinoyi Castellani 1910.

Encontrada no escarro, cresce muito bem no meio de Sabouraud no agar glycosado e nos outros meios assucarados.

Na glycose ordinaria tambem se desenvolve, si bem que menos abundantemente do que nos meios precedentes.

Não coagula e leite, nem liquefaz a gelatina e o sôro.

Com a glycose, levulose e maltose, fermenta produzindo gaz.

Monilia metalondinenses Castellani, 1916

Foi isolada em um caso de endomycose da aboboda palatina.

Fermenta produzindo gaz a glycose, levulose, maltose e galactose.

Bacillus coli-communis Escherich, 1885

Isolado pela primeira vez das fézes de um recem nascido.

E' um hospede do intestino humano, mórmente do intestino grosso, sendo tambem encontrado nos animaes.

Desenvolve-se muito bem em caldo, agua peptonada, sôro coagulado, meios lactosados, etc.

Com a glycose, levulose, naltose, galactose, pentose e lactose fermenta e produz gaz.

Bacillus paratyphosus B Schottmüller

Responsavel, no ser humano, pelas infecções paratyphoides, apresenta este bacillo uma grande resistencia em meio cultural, tanto que culturas de seis meses e, mesmo de um anno, são resemeadas com successo.

Com a glycose, levulose, maltose, galactose e pentoses fermenta produzindo gaz.

B) Após a semeadura destes germes, segundo a ordem já indicada, collocamos os tubos durante quatro dias na temperatura de trinta e cinco gráos centigrados, afim de que a incubação se processe.

Depois de passados os quatro dias da incubação é que se vae proceder a leitura dos resultados, isto é, vamos verificar quaes os tubos que apresentam fermentação com producção de gaz, o que se observa, graças ao emprego do tubo de Durham.

IV) Conclusões:

A) A urina contém uma unica substancia reductora:

a) Houve producção de gaz e fermentacão em todos os tubos.

Conforme sabemos, o unico assucar que fermenta e produz gaz em presença de todos os

germes que inoculamos nos tubos, é a glycose, logo devemos concluir que a substancia reductora seja a glycose.

b) Houve fermentação e producção de gaz nos tubos dois, tres, quatro, cinco e seis, e não houve no tubo um.

Sabemos que a *monilia balckanica* só fermenta a glycose e que a levulose é fermentada por todos os outros germes que empregamos, portanto, neste caso, a responsavel pela reducção foi a levulose.

c) Houve fermentação e producção de gaz nos tubos tres, quatro, cinco e seis e não houve nos tubos um e dois.

Considerando que a maltose produz gaz e fermenta em presença dos germes inoculados nos tubos tres, quatro, cinco e seis e que isso não acontece em presença dos tubos um e dois, facil será concluir que a substancia reductora foi a maltose.

d) Houve fermentação e producção de gaz nos tubos quatro, cinco e seis e não houve nos tubos um, dois e tres.

Conforme vimos, a galactose produz gaz em presença dos germes semeados nos tubos quatro, cinco e seis, não tendo, porém, igual procedimento em face dos germes dos tubos um, dois e tres, d'onde se deverá concluir que o licor de Fehling foi reduzido pela galactose.

e) Houve fermentação e producção de gaz nos tubos cinco e seis, ao passo que não houve nos tubos um, dois, tres e quatro.

Pelo facto das pentoses sómente fermentarem produzindo gaz em presença dos germes existentes nos tubos cinco e seis, devemos deduzir que a reducção do licor de Fehling foi observada, graças á presença das pentoses.

f) Houve fermentação e producção de gaz no tubo cinco e não houve nos tubos um, dois, tres, quatro e seis.

Sabendo que a lactose só produz gaz em presença do *bacillus coli-communis*, o qual foi semeado no tubo cinco, responsabilisaremos pela reducção a lactose.

g) Se em nenhum dos tubos houver producção de gaz, facil será concluir que nenhum dos assucares Fehlingreductores foi o responsavel pela reducção e que esta foi devida á presença de substancias reductoras, não fermentesciveis, taes como o acido urico, a creatinina, o acido hippurico, etc.

B) A reducção foi motivada por mais de um assucar.

Admittindo-se a hypothese de que a urina contenha mais do que um assucar, poderemos muitas vezes, com relativa facilidade, determinar quaes os assucares nella existentes, com o auxilio do presente methodo, sendo que, aqui empregaremos, além dos germes, já citados, o *B. Morgani Castellani* e *Chalm.*, que tem a propriedade de fermentar, produzindo gaz a glycose, levulose e maltose.

Si uma urina depois de fermentada com

producção de gaz pela *monilia balckanica Castellani* tiver identico procedimento em presença da *monilia Krusei Castellani* devemos concluir, neste caso, que a urina contém, além da glycose, a levulose.

Isto podemos affirmar desde que tenhámos empregado raças de *monilia Krusei Castellani* e *monilia balckanica Castellani* que possuam quasi o mesmo poder fermentescivel sobre a glycose.

Supponhamos agora o caso de uma urina que, depois de fermentar produzindo gaz em presença da *monilia balckanica Castellani* e da *monilia Krusei Castellani* tenha o mesmo comportamento em presença do *B. Morgani Cast.* e *Chalm.*, neste caso, devemos concluir que a urina seja portadora, não só de glycose e levulose, como tambem de galactose.

A determinação da presença de diversos assucares ainda não nos offerece a segurança desejada, pois, os seus resultados ainda são em alguns casos, muito falhos.

IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTANCIAS REDUCTORAS DO LICÔR DE FEHLING (SEGUNDO CASTELLANI E TAYLOR)

SUBSTANCIAS REDUCTORAS	SIGNAES CONVENCIONAES [0] = ausencia de reducção ⊕ = fermentação					
Substancias reductoras não fermentesciveis dos grupos creatinina, acido hippurico, acido urico, etc.	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
Lactose.	⊕	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
Pentoses.	⊕	⊕	[0]	[0]	[0]	[0]
Galactose.	⊕	⊕	⊕	[0]	[0]	[0]
Maltose.	⊕	⊕	⊕	⊕	[0]	[0]
Levulose.	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	[0]
Glycose.	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
GERMES	*B. COLI ESCHERICH*	*B. PARATYPHOSUS B SCHOTT.*	*M. METALONDINENSIS CAST.*	*M. PINOYI CAST.*	*M. KRUSEI CAST.*	*M. BALCANICA CAST.*

Diagnostico pelo processo bio-chimico

Consiste este methodo em identificar um dado assucar, não só baseado na reducção do licor de Fehling, como tambem no poder de fermentar e produzir gaz em presença de certos germes.

Para citar um exemplo mais frizante, daremos a seguir as fórmulas propostas por Castellani e Taylor, para identificar a lactose e as pentoses.

Para a lactose, vamos verificar primeiro se a urina é reductora do licor de Fehling, se fermenta em presença do *B. paratyphosus B Schott*, e si tem identico procedimento em presença do *B. coli-communis Escherich*.

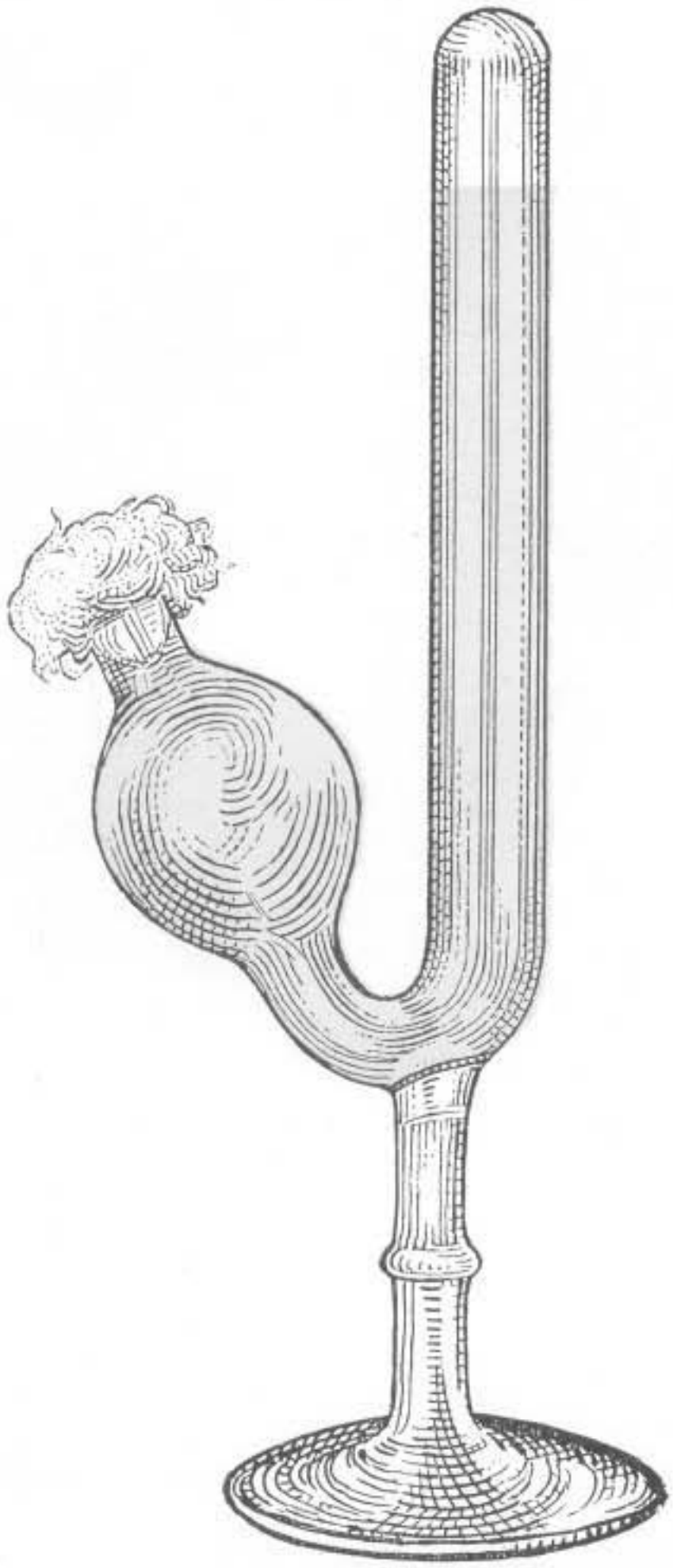
No caso da urina ser Fehlingreductora, de não fermentar com o *B. paratyphosus B* e de fermentar com producção de gaz quando semeado com o *B. coli-communis Esch.*, poderemos concluir que a urina contém lactose, cuja fórmula bio-chimica de diagnostico será:

Fehling	+	= Lactose
B. Paratyphosus B (Schott)	0	
B. Coli Communis (Esch.)	+	

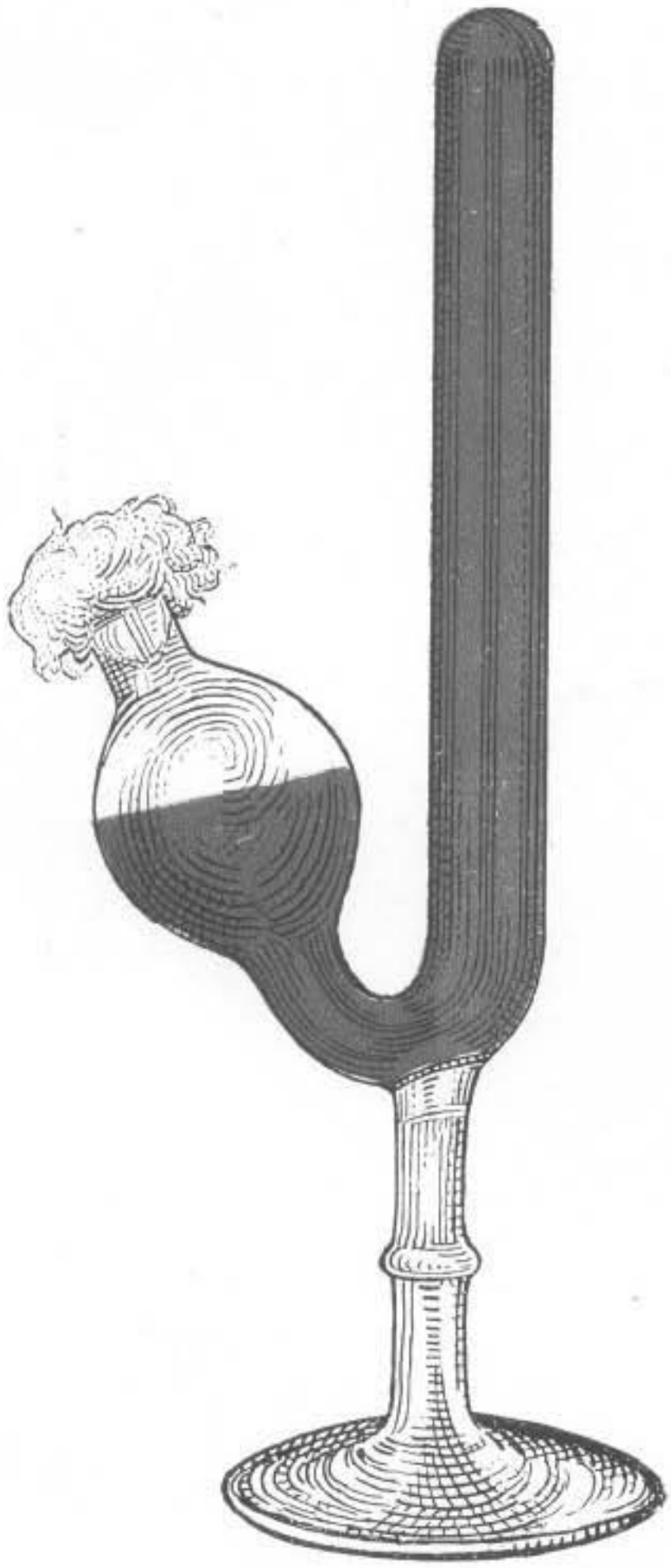
No caso de termos uma urina Fehlingreductora que fermente produzindo gaz em presença do *B. paratyphosus B (Schott)* e do *B. coli-communis (Esch.)* e que não fermente em presença da *monilia tropicalis*

(*Castellani*), concluiremos que a urina é portadora de pentoses, cuja fórmula bio-chimica de diagnostico será:

Fehling	+	= Pentoses
Monilia Tropicalis Castellani	0	
B. Paratyphosus B (Schott)	+	
B. Coli Commuis (Esch.)	+	



Positivo



Negativo

Methodo myco-bacteriologico de Castellani e Taylor

Technica do Professor Pereira Filho

1.º — Aquecimento da urina a uma temperatura de 60º durante uma hora.

2.º — Addicção á urina de algumas gottas de soluto de phenolsulphonephthaleina conténdo seis milligrammas por centimetro cubico e algumas gottas de solução deci-normal de soda esteril, até que a mistura fique alcalina (coloração vermelha).

3.º — Destribuição aseptica da mistura em sete tubos de Durham ou nos tubos identicos aos do *cliché* ao lado.

4.º — Ao primeiro tubo addiccionamos 2 cc de soluto de albumina glycerinada (*) e agua peptonada concentrada (cincoenta grammas de peptona, vinte e cinco grammas de chlorureto de sodio e cem centimetros cubicos de agua destillada) na proporção de dois decimos de centimetro cubico para cada dez centimetros cubicos de urina.

5.º — Aos outros seis tubos addicionamos unicamente agua peptonada concentrada nas mesmas proporções.

(*) *Albumina glycerinada* — Albumina + agua destillada em partes iguaes + 10 % de glycerina, tudo esterilizado ao autoclave á 115º, durante 20 minutos.

6.º — Procedemos a semeadura do *gonococcus de Neisser* no primeiro tubo. Nos outros tubos semeamos respectivamente:

No segundo a *M. Krusei.*
No terceiro a *M. Pinoyi.*
Eo quarto a *M. Metalondinenses.*
No quinto o *B. Paratyphico B.*
No sexto o *B. Coli.*
O setimo ficou como tubo testemunha, portanto sem semeadura.

7.º — Procedemos em seguida a incubação na estufa á 37º durante tres dias e lemos os resultados de doze em doze horas.

8.º — Conclusões: Fermentação positiva nos seis primeiros tubos e ausencia de fermentação no tubo testemunha (n. 7) = glycose.

Ausencia de fermentação nos tubos 1 e 7 e fermentação nos demais = levulose.

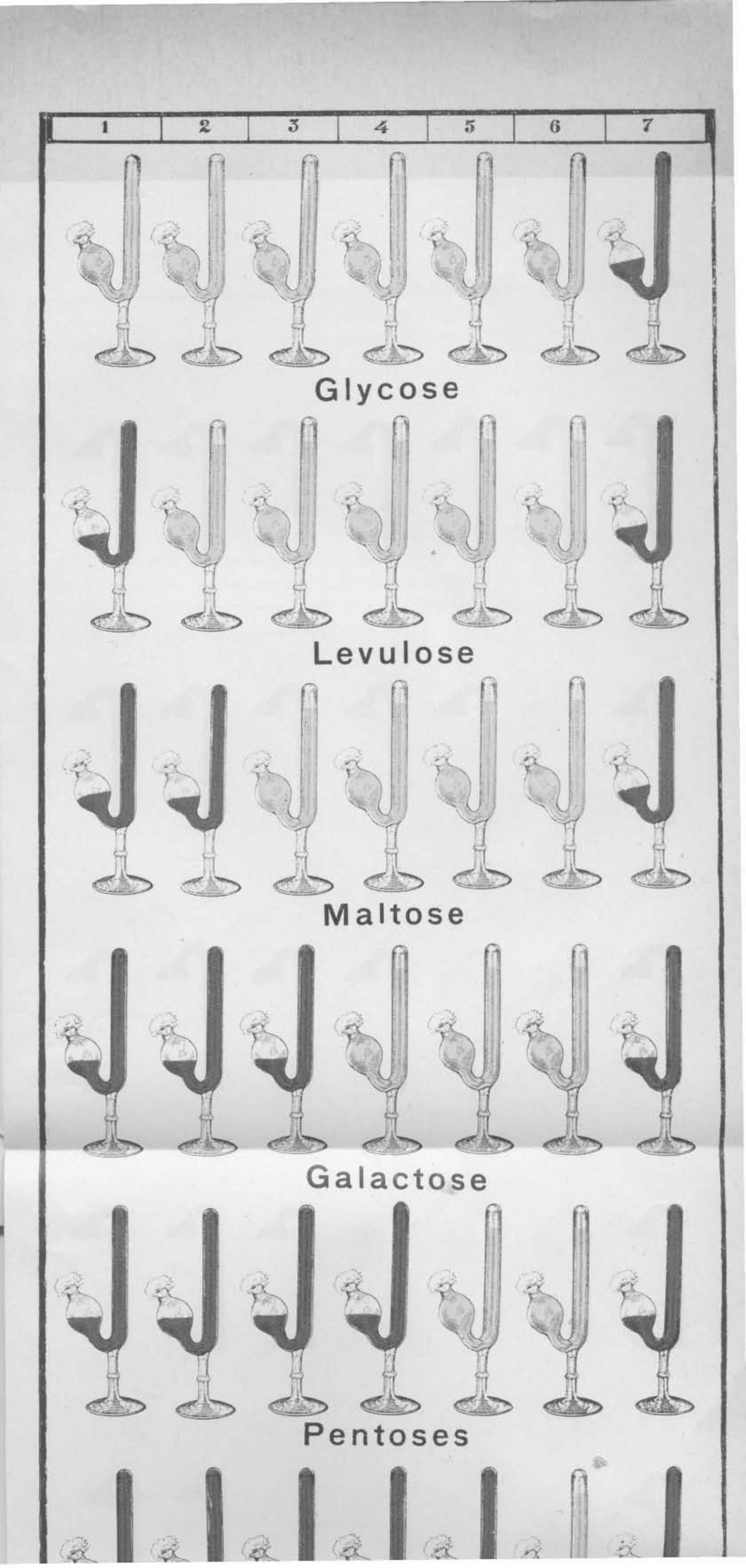
Ausencia de fermentação nos tubos 1, 2 e 7 e fermentação nos outros tubos = maltose.

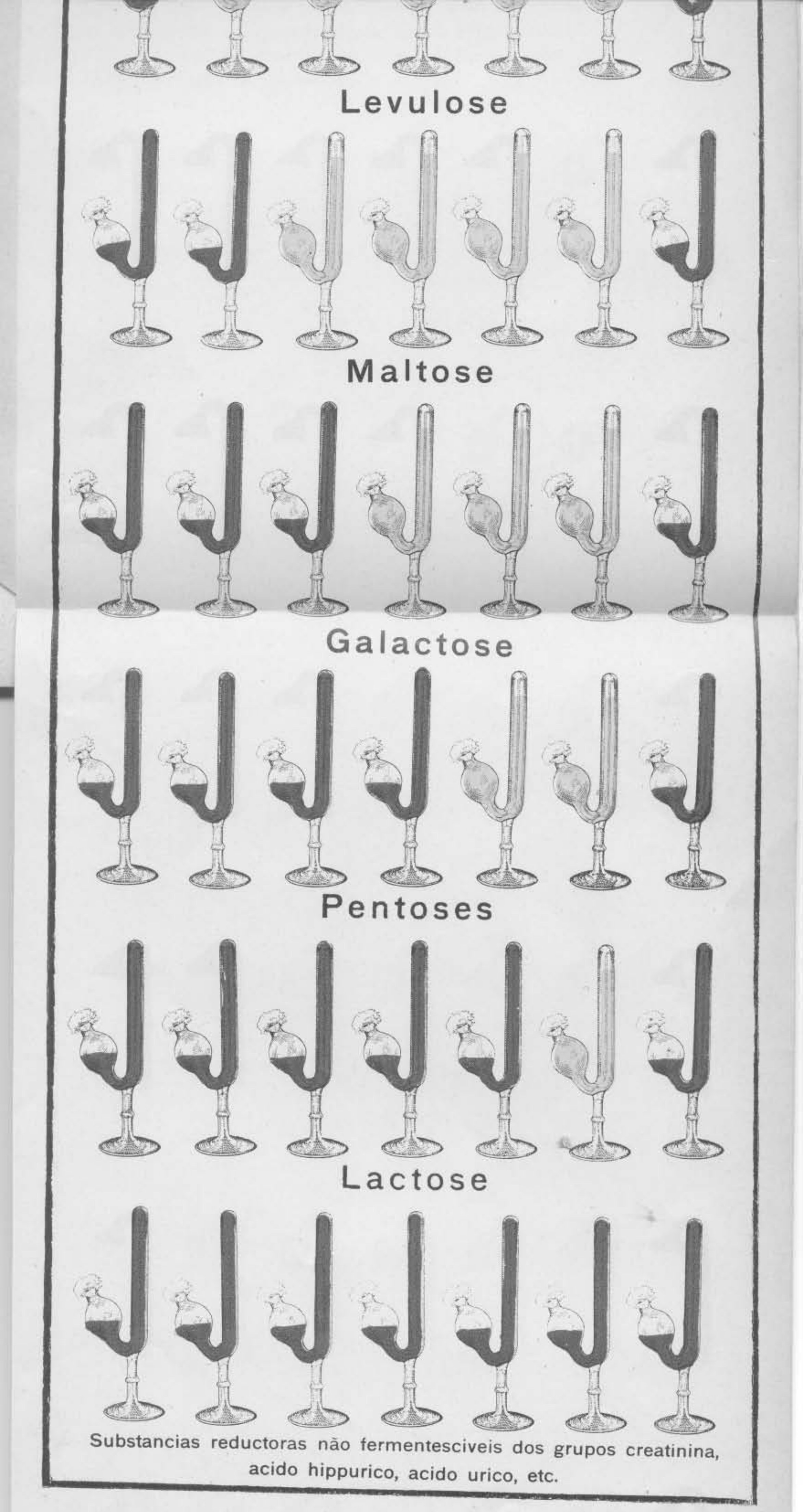
Ausencia nos tubos 1, 2, 3 e 7 e fermentação nos tubos 4, 5 e 6 = galactose.

Ausencia de fermentação nos tubos 1, 2, 3, 4 e 7 e fermentação nos tubos 5 e 6 = pentose.

Fermentação unicamente no tubo 6 sem que o mesmo se observe nos demais tubos = lactose.

Finalmente ausencia de fermentação em todos os tubos é signal de que a substancia responsavel pela reducção não é fermentescivel e pertence aos grupos creatinina, acido hippurico, acido urico, etc.


1
2
3
4
5
6
7
Glycose
Levulose
Maltose
Galactose
Pentoses



Substancias reductoras não fermentesciveis dos grupos creatinina, acido hippurico, acido urico, etc.

Pelo processo colorimetrico, podemos facilmente determinar o Ph do liquido que foi semeado e incubado e do que serviu de testemunha, portanto não semeado.

A technica proposta pelo Prof. Pereira Filho apresenta, além doutras, a grande vantagem de substituir a *monilia Balckanica*, pelo *gonococco de Neisser*.

Deve ser esta substituição considerada como vantajosa devido á difficuldade que se encontra para isolar a *monilia Balckanica*, pois Castellani conseguiu isolal-a uma só vez, e a unica amostra que este grande sabio possuia, foi perdida em um incendio no seu laboratorio. A não obtenção da *monilia Balckanica* acarreta a impossibilidade de empregar-se na pratica corrente a technica de Castellani e Taylor, ao passo que, graças á sua substituição pelo *gonococco de Neisser*, isto é, segundo a technica do Prof. Pereira Filho, o presente processo poderiá prestar-nos relevantes serviços na pratica diaria.

CONCLUSÕES

PRIMEIRA:

O methodo myco-bacteriologico, de grande simplicidade technica, permitte a facil identificação das substancias reductoras da urina.

SEGUNDA:

Ficam, deste modo, evitados os erros immensos comettidos na pratica corrente pelo emprego exclusivo do licor de Fehling.

TERCEIRA:

É indispensavel que as culturas empregadas estejam rigorosamente puras.

QUARTA:

A modificação proposta pelo professor Pereira Filho allia á facilidade da leitura dos resultados uma maior garantia de diagnostico.

Bibliographia

Desgrés — Chimie médicale.

G. Deniger — Chimie analytique.

Barral — Analyse chimique.

A. Ronchése — Analyse des urines.

P. Yvon e **Ch. Michel** — Analyse des urines.

M. Arthus — Chimie Physiologique.

Fróes — Semiologia da urina.

L. L. Koninck — Chimie analytique.

V. Villavecchia — Traité de chimie analytique.

Dopter e **Sacquépée** — Bactériologie

Aldo Castellani and **Albert J. Chalmers** — Manual of Tropical Medicine.

The Journal — of the American Medical Association.