

V cat
DR. NEY CABRAL

398

NEPHELOMETRIA

These de concurso

1919



ED
16.075
117n
919

PORTO ALEGRE
ARIA DO GLOBO — Barcellos, Bertaso & C.
Maria, Cruz Alta e Uruguayna

3

THESE DE CONCURSO

á SECÇÃO DE PHYSICA MÉDICA

APRESENTADA Á

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

PELO

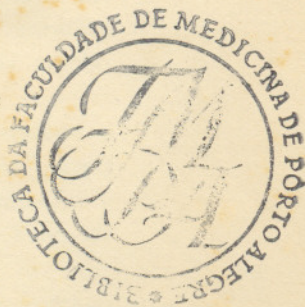
D.^R DEY DA COSTA CABRAL

Formado pela Faculdade de Porto Alegre.
Regente interins de Physica Médica na
mesma Faculdade. Médico extra-numera-
rio e 1.^o adjunto da 14.^a Secção da S.
Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Nephelometria

(Sobre um novo aparelho)

ABRIL - 1919



PORTO ALEGRE

Officinas graficas da LIVRARIA DO GLOBO — Barcellos, Bertaso & C.

Filiaes: Santa Maria, Cruz, Alta e Uruguayana



Bib.Fac.Med.UFRGS

T-0191

Nephelometria; (sobre um novo

Uma palavra

Não extranhem os que vão lêr e julgar este meu trabalho a pouca extensão com que é elle exposto.

A nephelometria, embora nascida em 1895, não tem merecido dos autores de livros médicos a devida attenção.

Foi, realmente, grande a minha surpresa por não vê-la, sequer mencionada, nos autores francezes, italianos e hespanhóes que escrevem sobre physica médica, ou sobre exames de laboratorio, em geral.

Por menção de autores norte-americanos, sei haver algo escripto em allemão, sem, porém, conseguir obter os artigos citados.

As poucas noções que colhi sobre nephelometria me vieram de revistas norte-americanas, sendo-me, entretanto, impossivel lêr os numeros d'ellas que mais amplamente elucidam o assumpto.

Com tão resumida bibliographia, comprehende-se a difficuldade em minuciar a materia, tanto mais porque recente é a data em que me dediquei ao seu estudo.

Esta these não é, pois, trabalho completo. Tem, tão sómente, o fim de iniciar entre nós o estudo da nephelometria, creando o nephelometro e dando aos estudiosos motivo para mais demoradas e importantes pesquisas.

O principal valor, se tal é valor, deste trabalho é ter

construido as peças que, substituindo algumas do colorimetro de *Duboscq*, formaram o nephelometro imaginado por H. R. *Bloor*.

A parte pratica do trabalho limita-se quasi só á experimentação e prova de que o apparelho desempenha os seus fins.

Se mais não pratiquei com elle, foi pelo receio de invadir, em demasia, o terreno da *Chimica*, muito embora saiba dos laços que unem esta á *Physica*.

I

Chromometria

Tão suggestivo me pareceu o artigo de H. R. *Bloor* em "The Journal of biological chemistry" de Agosto de 1915, n.º I, vol. XXII, pag. 145, sob o titulo "A simple methodo of converting the Duboscq colorimeter into a nephelometer", que julguei util a realisação da idéa, valendo-me dos poucos recursos do nosso meio para construir o novo nephelometro e sugerial-o ás provas.

A colorimetria — cujo termo mais racional deve ser "chromometria" (1) — consiste em avaliar a quantidade d'uma substancia em solução, mediante a comparação entre a coloração de tal soluto e a d'uma outra solução—padrão da mesma substancia. Tal methodo se esteia no facto de conterem duas soluções d'um mesmo corpo, que surgem com igual gráu de colorido, — proporções de materia tinctoria inversamente proporcionaes ás espessuras sob as quaes nasce a egualdade de coloração.

A dosagem por tal methodo não eguala em exactidão as medidas ponderaes, mas vence-as na vantagem de ser usavel quando minima é a quantidade de substancia a avaliar.

Só para dosar a substancia corante do sangue, sóbram os apparatus ideados, desde os de *Tallqvist*, *Hayem* (I e II), *Fleischl-Mischer*, *Gowers* e *Malassez* (I e II), até os *Sahli* e *Autenrieth* e *Königsberger*.

1) — *Littre* — Dic. Méd.

Mais extenso é o uso do colorimetro de *Duboscq.* Além da hemoglobina, com elle se dósa o iodo da urina, o acido salicylico da mesma excrecção, o indol e o phenol urinarios, a ammonia da urina, o azul de methyleno e a rosanilina durante a exploração renal, o ferro do sangue, a cholesterina do mesmo liquido, o volume dos derrames pleuraes, os phenoos e o cholesterol do sangue, etc.

E' este colorimetro o escolhido por *Bloor* para transformar em nephelometro.

Faz-se, pois, necessaria a descripção d'elle, para melhor percepção das mudanças praticadas com tal proposito.

N'um suppôrte metallico estão duas cubas cylindricas de vidro (C e C¹), (fig. I) fixadas uma ao lado da outra, com fundo tambem de vidro e recebendo por elle a luz reflectida pelo espelho horizontal M.

Nellas mergulham cylindros de vidro (T e T¹), mais ou menos completamente, e que são movidos por uma cremalheira lateral, propria para cada um d'elles. Superiormente, está a caixa do prisma, contendo um duplo parallelipedo de *Fresnel* (P e P¹) e, mais ácima, a ocular (A) para o observador.

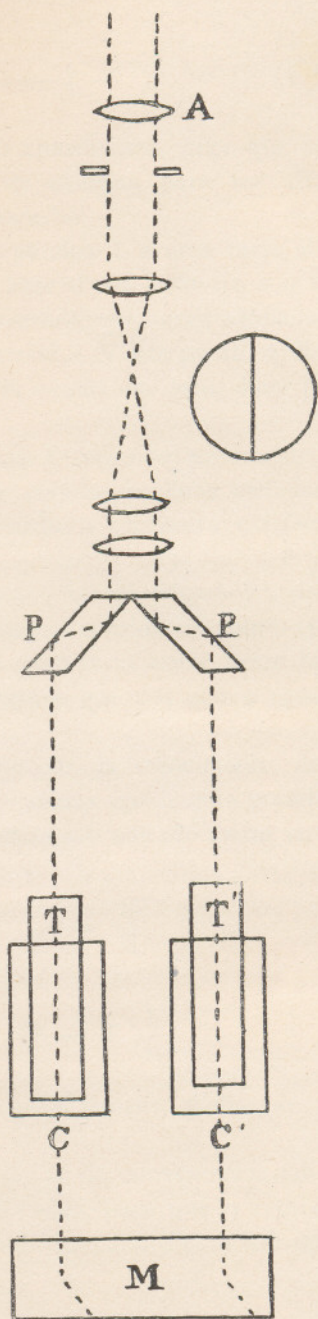
Na face posterior do supporte, estão gravadas duas escalas de *Nonius*, em millimetros, separadamente para cada cremalheira lateral.

Quando reflectidos pelo espelho plano, os raios luminosos vão atravessar as cubas e os cylndros de vidro, chegando aos parallelipedos que os approximam. Depois de atravessarem as lentes, surgem á luneta do observador.

No campo, é visto um disco luminoso cortado por uma linha negra em duas partes iguaes.

Posta em C a solução-typo e em C¹ o soluto em exame, desce-se ambos os cylindros, até o fundo das cubas.

Fig. 1 — Colorimetro de DUBOSCQ



JULES DUBOSCQ - PH. PELLIN

Para funcionar o colorimetro, urge que se lhe dê uma certa espessura de solução, para ser atravessada pelos raios de luz do espelho.

Ergue-se, pois, o cylindro T a uma certa altura. O espaço creado entre a base d'esse cylindro e o fundo da cuba respectiva é a *espessura*, que surge avaliada em milímetros na escala posterior. N'este ponto, o disco luminoso está desigualmente tincto em seus dous hemispheros.

Então, é o cylindro T¹ erguido lentamente, até que se mostrem igualmente coradas as duas metades do disco, notando-se, pela escala, a espessura existente d'esse lado.

Para dosar a substancia em exame P¹, designemos por P o peso da substancia contida no soluto-tipo e por E a espessura que foi necessario crear desse lado, designando por E¹ a espessura que nos deu a egualdade de coloração no disco.

Applicando o principio, já mencionado, de estarem as quantidades de substancias igualmente coradas na razão inversa das espessuras sob que são assim vistas, nasce a proporção

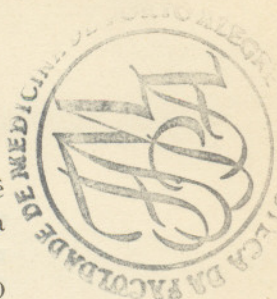
$$\frac{P}{P^1} = \frac{E^1}{E}$$

e, por conseguinte,

$$P^1 = P \cdot \frac{E}{E^1}$$

E' util repetir varias provas, d'ellas se tirando a média.

Não necessita dizer-se da conveniencia em serem as cubas igualmente calibradas, para que o recebimento de luz se proceda em identicas condições e sob igual espessura.



Nem só da mesma substancia poderá ser o soluto-modelo: outra substancia que dê côr semelhante e mesmo um solido (papel, madeira, vidro, etc.), servem de typo. Compreende-se, porém, a difficuldade em alcançar, assim, corados identicos, não esquecendo a facilidade com que se descôra á luz a solução — padrão. Faça-se, pois, no momento preciso, o soluto-testemunha.

A difficuldade em comparar os dous coloridos cresce, se lembrarmos as varias dyschromatopsias pathologicas e o papel que, no acto, desempenha o coefferente pessoal de cada observador, i, é, a sua agudeza visual.

De inicio difficultosos, taes exames adquirem mais exactidão pelo habito em practical-os, mórmente para as soluções mais concentradas, as mais expostas a erro.

— A rapida fadiga ocular de quem observa tambem merece menção. Não se demore, pois, mais de 10 segundos a olhar na ocular, se se quer perceber as mais leves variações do colorido.

*Folin e Denis*¹ descobrem no aparelho de *Duboscq*, como defeitos:

- a) a inexactidão dos zeros das escalas;
- b) a desigualdade de illuminação nos campos;
- c) outros inconvenientes, surgidos quando são grandes as variações no gráu de coloração dos liquidos a medir, obrigando-nos a usar dous colorímetros differentes.
- d) a exposição á intervenção do pó.

Dada esta breve descripção do chromometro, segue mencionada a maneira de transformal-o em nephelometro.

1) «J. Biol. Chem.» — 1916 — XXVI, pag. 484.

Nephelometria

A nephelometria consiste em determinar pequenas quantidades de substancia, por medida da turvação do precipitado que tal substancia fornece, quando submetida a reactivo adequado.

O primeiro nephelometro é invenção de *Richards* (1) e data de 1895. No entanto, e apesar de tantos annos decorridos, em nenhum autor francez, nem italiano, dos muitos folheados, encontrei referencia á nephelometria, só tratada por allemães e, principalmente pelos norte-americanos, sendo mui escassa a litteratura sobre o assumpto.

Nem conhecia o apparatus, por não existir em nosso meio.

Em 1913, surgiu novo typo de nephelometro, ideado por *Kober*, (2) valendo-se de transformações no chromometro de *Duboscq*, como no caso presente.

No de *Kober* ha o inconveniente de mergulharem os cylindros nas cubas e de serem elles recobertos d'uma substancia qualquer, que os resguarda dos raios luminosos. Assim, quando minima é a quantidade de substancia a dozar, a presença do cylindro n'ella immerso predispõe á contaminação com substancias intermedias, impossiveis de evitar. E não se esqueça a ameaça

1) — *T. W. Richards*, «Ztschr für anorg. chem.», 1895, pag. 269.

2) — *Kober*, in «Jour. Am. Chem.», 1913, pag. 1585.

em ser mais ou menos soluvel, nos solutos usados, o revestimento dos cylindros.

O nephelometro de *Marshall-Banks* tem iguaes columnas de suspensão e aproveita a luz reflectida por meio de um photometro proprio.

A parte photometrica do aparelho consta d'uma barra de vidro tinctoria, consistindo a disposição optica, para observar os dous feixes luminosos, n'um simples arranjo de espelhos, com o que se obtém um campo visual maior do que o do colorimento *Duboscq.*

No nephelometro de *Lenzmann-Kober*, a inexactidão dos zeros da escala é corrigida por artificios applicados ás cremalheiras lateraes. Está o aparelho resguardado do pó ambiente, pois não existem espaços abertos entre a ocular e o liquido contido nas cubas. Ao demais, a escala e o instrumento são feitos de modo a permittir a medida das soluções n'uma altura de 11 centimetros. N'elle, os tubos nephelometricos são fundidos, em vez de cimentados e feitos d'uma peça inteiriça, usavel para todos os dissolventes. O desenho do campo, em vez de ser dous semidiscos, consta d'um pequeno quadrado inscripto n'um circulo, o que o torna mais commodo para a visão e mesmo mais sensivel.

Mais recentemente, em "J. of. B. C." de marco 1917, n.º 2, P. A. *Kober* descreveu mais um modelo de nephelometro, por elle creado. No novo aparelho, pôdem ser eliminadas as cortinas negras do de *Bloor*, mediante um arranjo de parafusos.

Parte importante d'esse novo nephelometro é a caixa da lampada. Luctava-se com a falta d'uma luz propria, de 6 a 20 *volts*, necessaria para obter-se feixes de raios luminosos parallellos, sem o emprego de luz electrica muito forte. O arranjo, no novo aparelho de *Kober*,

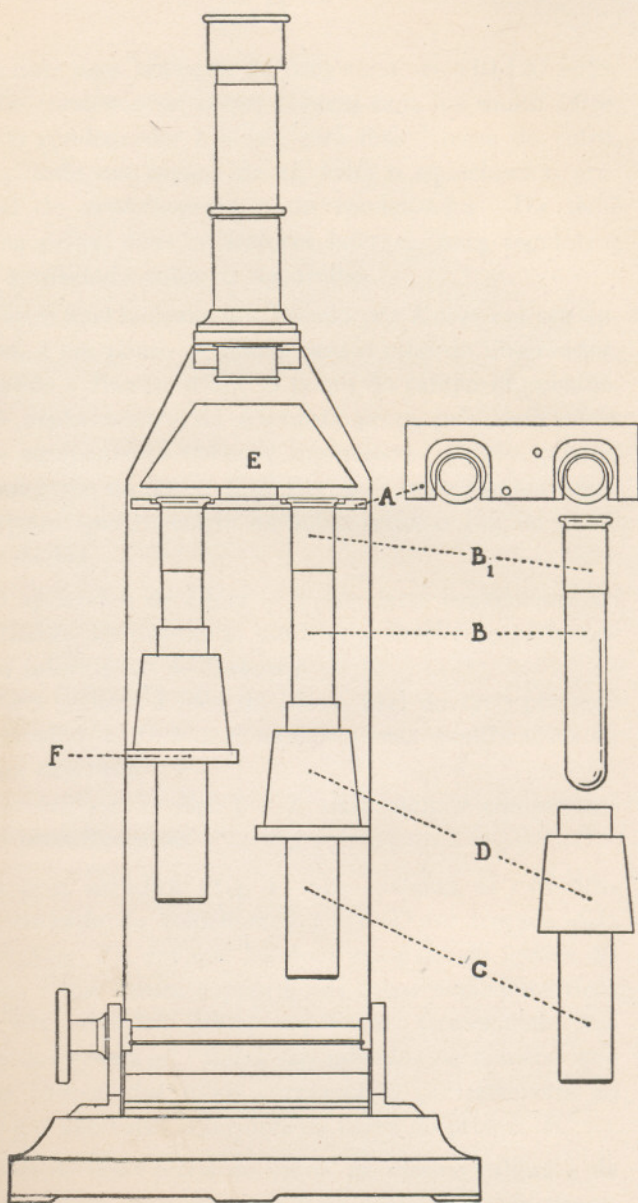


Fig. 2 - As peças novas que, substituindo outras do colorimetro, fôrman o nephelometro.

faz-se com uma lampada de tungsteno, de 110-120 *volts*, com um condensador, o que fornece uma luz muito forte. Entre o condensador e a luz, está uma lamina de vidro, que, creando um espaço de ar, evita o aquecimento prejudicial do nephelometro e do condensador. Ha tambem, na caixa, dous repletores lateraes, para regularem a luz projectada sobre o aparelho.

Outro aperfeiçoamento, creado por *Kober* em seu aparelho, é um ponto de apoio para o olho do observador, facilitando a fixação d'um só ponto do campo illuminado.

O nephelometro de *Richards* pécca pela deficiencia de seu equipamento optico e mechanico. Expõe, porém, a menos erros do que o de *Kober*, pois nelle são corredios os corpetes que revestem as cubas, com o fim de guardal-as da luz.

O aparelho de *Bloor* serve-se deste conveniente do de *Richards*, aproveitando tambem a excellente parte optica do colorimetro de *Duboscq*.

Para realizar a idéa de *Bloor*, usei do typo pequeno do aparelho de *Duboscq*, com pequenas modificações na technica descripta.

Compare-se as fig. 1 e 2, para melhor comprehensão da transformação.

A peça metalca (fig. 1) que sustenta os cylindros mergulhadores do colorimetro (T e T^1) é trocada pela peça *A* (fig. 2), em que ha dous encaixes de iguaes dimensões e que fazem suppôrte aos tubos nephelometricos (*B*). Os rebórdos destes repousam, firmemente, nos bórdos dos encaixes. Estes são talhados de maneira que a linha central dos tubos corresponda perfeitamente ao centro das aberturas inferiores da caixa do prisma, *E*.

Usei de dous tubos de vidro, de mesmo calibre e de igual espessura, com quatro e meio centimetros de altura,

8 millímetros de diâmetro, e dous centímetros cubicos de capacidade.

As cubas C e C¹ do aparelho de *Duboscq* são substituidas pelos corpetes metallicos C (fig. 2), que estão suspensos, por meio de virólas metallicas, nos orificios F que supportavam as cubas colorimetricas. A cremalheira lateral eleva ou abaixa esses corpetes, que revestem os tubos nephelometricos. No nephelometro, a luz vêm da frente e não da parte inferior, de modo que o espelho horizontal M (fig. 1), não é usado. Cobri-o com papel negro.

Usei, no caso, corpetes de cobre, com quatro centímetros de altura, um centimetro de diâmetro e um millimetro de espessura.

Eleva-se, por meio da cremalheira, cada corpete, até que o indice da escala posterior alcance os zeros. Então a parte superior do tubo B, que excede á bórda superior do corpete respectivo, n'uma altura de 1 centimetro, é tincta de negro pelo verniz. Do mesmo modo é tincto o fundo do tubo, n'uma altura de 1 centimetro, o que substitue o fechamento inferior do corpete, segundo a technica de *Bloor*.

Os corpetes e os tubos são marcados com um signal qualquer, para que permaneçam sempre do mesmo lado.

Não póde, pois, ser mais facil, nem rapida a technica da transformação.

O aparelho é collocado n'uma caixa de madeira (fig. 3), internamente pintada de negro e cujo fundo, por onde penetra o nephelometro, é fechado por uma cortina de panno preto.

As dimensões desta caixa são:

Comprimento = 30 centímetros

Altura = 14 ½ centímetros

Largura = 15 centímetros

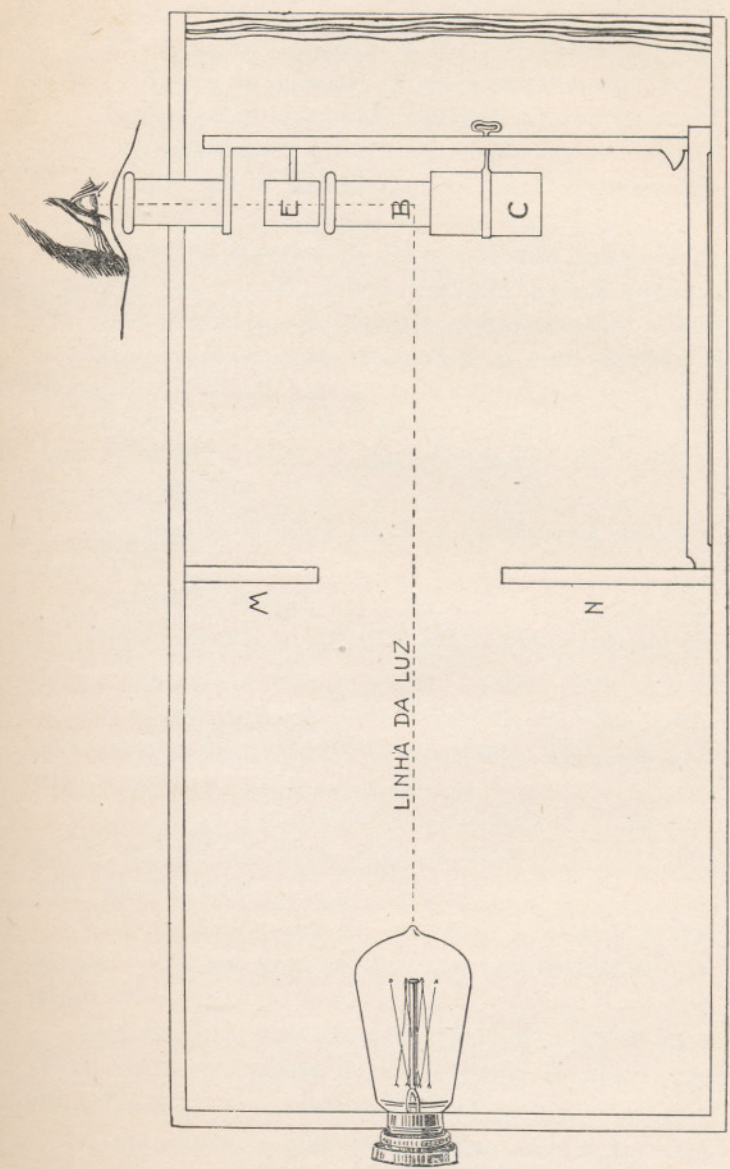


Fig. 3 — A camera escura, que contém o nephelometro (original)

Altura do anteparo M = 4 centímetros

Altura do anteparo N = 6 centímetros.

O anteparo M está unido á parede superior da caixa.

O nephelometro é posto em contacto com o anteparo N, de modo que a sua posição na caixa é conservada constante.

Na parede superior da caixa e a uma distancia de quatro centímetros da cortina, está um orificio circular, com dous centímetros de diametro, no qual passa o tubo metallico do colorimetro, collocando-se externamente a ocular.

Os anteparos são de madeira, occupam toda a largura da caixa e estão a dez centímetros de distancia da cortina negra.

O anteparo M desce até a altura da peça metallica A da fig. 2.

O anteparo N. sóbe até á altura do rebórdo superior do corpete, quando o indice marca o limite inferior da escala.

Permanece, entre os dous anteparos, um diaphragma com quatro e meio centímetros de altura, pelo qual passam os raios de luz da lampada.

O pé d'esta lampada passa n'um orificio circular da parede anterior da caixa, sendo o suppôrte d'ella collocado externamente.

Usei de 2 lampadas de tungsteno ("Mazda") unidas em série, cada uma de 50 *watts*, com a voltagem total de 230.

Ficando uma das lampadas fóra da caixa, e para evitar o seu incommodo, é ella revestida de negro, não perturbando assim o observador.

A observação é feita n'um quarto escuro, ou n'um canto de sala onde haja penumbra. Para evitar a luz

ambiente, usei do artificio de cobrir a cabeça com um panno negro.

Estando o nephelometro preso á caixa pela sua luneta, não é necessario retiral-o para collocar os tubinhos nephelometricos, bastando, para isso, dar-lhe um movimento de rotação, pois assim o permite a largura do orificio da parede superior da caixa.

A ocular é elevada ou abaixada, até se obter o fóco.

A parede superior da caixa não é fixa, correndo n'uma gotteira feita nas duas paredes lateraes.

O nephelometro só se applica á medida de pequenas quantidades de substancias que originam turvação, quando sujeitas a detérminados reactivos.

A technica de dosagem é identica á do colorimetro.

Creada e precipitada a solução — modelo, usei-a sempre no tubo que occupa o lado direito do aparelho. No outro tubo, está a solução de substancia a dosar, na qual se derrama o reactivo que a precipita.

Ambos os tubos nephelometricos são erguidos até o ponto em que o indice marca zero na escala.

Torna-se necessario descer o tubo — testemunha, para dar a espessura precisa para a reflexão da luz.

Surge, então, illuminada a metade correspondente do disco luminoso.

Do mesmo modo, é descido o outro tubo, olhando-se pela ocular, até que a outra metade do disco surja e iguale em illuminação o primeiro semidisco apparecido.

Lidas ambas as escalas e conhecida a quantidade P de substancia do soluto-padrão, é determinada a quanti-

dade buscada P^1 , de accordo com a mesma fórmula do colorimetro:

$$\frac{P}{P^1} = \frac{E^1}{E}, \text{ d'onde } P^1 = P \frac{E}{E^1}$$

No primeiro ensaio a que sujeitei o aparelho, lancei mão de urina contendo traços nitidos de albumina. Usei para o tubo-estalão 2 cc. de urina contendo 1:1000 de albumina. No outro tubo usei uma solução a 1:2000.

Precipitada a albumina, em ambos os tubos, por algumas gottas de acido azotico ao 1/3, procedi á dosagem de experiencia.

O tubo-testemunha foi descido de zero, n'uma altura de cinco millimetros, apparecendo o semidisco illuminado. A espessura foi, pois, $E=5$.

Para o outro tubo, fez-se necessario abaixal-o n'uma distancia de 10 millimetros, ponto em que a illuminação do semidisco igualou a do outro, sendo, portanto, $E^1=10$.

Substituindo os valores na fórmula acima, obtive:

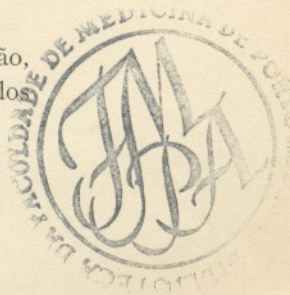
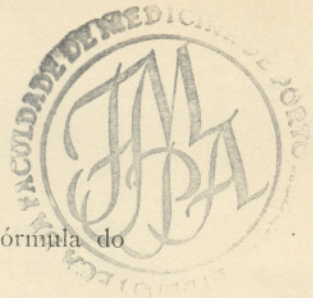
$$P^1 = 1 \cdot \frac{5}{10} = 0,5$$

Isto é, a substancia em exame dosou 0,5:1000, ou 1:2000.

Praticando outros ensaios, medindo préviamente a substancia de ambos os solutos, sempre verifiquei a exactidão dos dados vindos do nephelometro.

Em nephelometria, como em chromometria, convém praticar-se varios ensaios com o soluto a examinar, d'elles buscando-se a média.

Entre os processos antigos da medida de turvação, era uso fazer-se, em varios tubos d'ensaio, precipitados



de varios gráus com determinada substancia e que serviam de padrão para o precitado da substancia a medir.

O tubo d'esta era collocado, successivamente, em comparação com os precipitados-typos, sob igual illuminação, até que igualasse um d'elles, cujo titulo era préviamente estabelecido.

Havia mesmo um processo para avaliar o gráu de impedimento total na reacção de *Wassermann*, mediante a leitura mais, ou menos facil, d'um jornal collocado atraz dos tubos de reacção em que não existia a hemolyse.

A nephelometria é superior aos methodos ponderaes, no que respeita á rapidez de dosagem, com economia de tempo e de trabalho.

Quanto menor fôr a quantidade de substancia pesquisada, maior será a difficuldade no methodo ponderal. Pois é justamente n'estes casos e só nelles que se usa a nephelometria.

A estructura physica dos precipitados obtidos no methodo é variavel: pulverulentos, crystallinos, gelatinosos, em flócos, opalinos, etc.

Esses precipitados se depositam mais ou menos rapidamente, conforme a sua natureza, a temperatura, a sua densidade, etc. Além disso, ao crear-se o soluto-modelo, tem muita importancia o vehiculo usado para dissolver a substancia e a densidade d'esta.

A difficuldade em possuir, em certas occasiões, material que sirva de solução-padrão é vencida com a criação prévia de varias soluções tituladas, que são postas em frascos, aptas a serem usadas no momento preciso e mantidas intactas por qualquer substancia conservadora.

Feitas varias soluções das substancias que servirão de estalão no nephelometro, são ellas precipitadas, quando preciso, pelos reactivos adequados, usando-se *igual vo-*

lume do mesmo reactivo na solução a dosar, para um mesmo volume de ambos os solutos.

A nephelometria está sujeita a erros, quando praticada pelos que perderam a faculdade de distinguir as côres. Os resultados variam tambem com o gráu de agudeza visual do observador e com a pratica, mais ou menos antiga, que elle tem do methodo.

Ponto essencial em nephelometria é que, tanto a solução-typo como a que está em exame, tenham aspecto muito semelhante, para que os dous semi-discos não fiquem muito desigualmente illuminados, sendo então, impossivel igualar-lhes a illumination, percorrendo em vão toda a altura da escala.

Assim, se tomarmos para padrão, na dosagem da albumina urinaria, 0,25 centigrs. de «albumen ovi siccum», dissolvidos em 250 cc. de agua distillada (sol, a $1^{\circ}/_{00}$), impossivel nos será, com tal estalão, dosar a albumina existente na urina. Precipitadas ambas as soluções por um igual numero de gottas de acido trichloracetico e levadas aos tubos nephelometricos, nunca conseguiremos igual luz nos dous semi-discos: o correspondente á solução-modelô terá sempre a côr branca-leitosa, surgindo o outro semidisco com a côr da urina.

Para estabelecer, pois, estalões na dosagem de elementos urinarios, faz-se o soluto-typo, dissolvendo a substancia em estudo n'uma urina em que se verificou, préviamente, pelos reactivos adequados, a ausencia da referida substancia.

Se o corpo que queremos dosar existe em grande proporção no liquido em exame, fazemos com este varias diluições, procedendo, no fim do exame nephelometrico, ao calculo que nos indicará a quantidade de substancia existente na solução primitiva. Como exemplo simples: para dosar *traços carregados* de albumina n'uma urina,

diluíamos 5 cc. d'esta urina em igual volume d'outra urina em que não ha essa substancia. Dosada ao nephelometro esta diluição, o numero obtido para resultado é multiplicado por 2, pois a quantidade de albumina existente na urina em examé foi examinada n'um volume duplo do que ella occupa na urina primitiva.

Não bastando esta diluição, juntemos um igual volume (10 cc.) de urina sem albumina. A cifra então resultante deverá ser multiplicada por 4. E assim por deante, até obtermos uma solução que contenha pequena proporção de albumina.

III

Prova do nephelometro

Para verificar se o aparelho por mim creado funcionava perfeita e correctamente, submetti-o ás seguintes provas, nas quaes a substancia, tanto do estalão como do soluto a examinar, foi préviamente dosada, pelos outros methodos de dosagem usados. Nas provas seguintes, A representa o tubo-testemunha e B o que é cheio do soluto cuja proporção de substancia queremos dosar. Ambos os tubos, como já mencionei, têm a capacidade de 2cc.

I

Dosados os chloruretos da urina de E. G., pelo methodo de *Charpentier-Volhard*, encontrei o valor 5,013 $\frac{0}{100}$ para o chlorureto de sodio, que estava, portanto, em proporção inferior á normal.

D'essa urina, usei 10 cc., accrescentando a ella X gottas de acido azotico e V gottas de nitrato de prata. Obtive um precipitado de chlorureto de prata, com uma turvação branca-leitosa.

Lançando em ambos os tubos nephelometricos 2 cc. da solução, quando os indices marcaram 3 na escala, a illumination dos dous semi-discos foi identica, o que provava conterem ambos os tubos a mesma proporção de chlorureto.

II

Pesados, na balança decimal, 0,25 centigrammos de «albumen ovi siccum», foram elles dissolvidos em 250 cc. de urina sem albumina (sol. 1 ‰).

No tubo A colloquei 2 cc. d'esse soluto-estalo. Para o tubo B, usei 2 cc. da solucao formada por 2 cc. de liquido-testemunha + 2 cc. de urina isempta de albumina, i. e., 2 cc. d'urina contendo $\frac{1}{2}$ ‰ d'albumina.

Precipitada a albumina pelo acido trichloracetico, a espessura necessaria para A foi igual a 10 e para B = 20.

Logo, a quantidade de substancia, contida em B, e:

$$P^1 = \frac{10}{20} = 0,5 \text{ por mil}$$

III

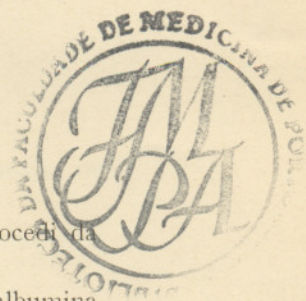
Dissolvi 0,10 centesimos de cc. de sangue de carneiro em 100 cc. de urina (sol. 1 ‰). O tubo A recebeu 2 cc. d'essa solucao, i. e., 0,002 millesimos de cc. de sangue, depois da turvacao obtida com o reactivo de *Florence* (1)

O tubo B recebeu a metade (2 cc.) do volume formado por 2 cc. da solucao-modelo + 2 cc. de urina sem sangue, i. e., recebeu 0,001 millesimo de cc. de sangue, precipitado pela mesma quantidade do reactivo. Para este tubo, quando o disco surgiu igualmente illuminado em suas duas metades, E' foi igual a 6 na escala.

Para o tubo A, E marcou 3.

$$\text{Logo } P^1 = \frac{3}{6} = 0,5 \text{ por } 1000 \text{ cc de}$$

1) Reactivo de *Florence*: Pyridina 50 g. — Alcool 50 g. — chloroformio 50 g. — Acetato de zinco 7,5 g.



Para fazer a contra-prova do aparelho, procedi da seguinte maneira:

Dosei, no albuminometro de *Aufrecht*, a albumina da urina de A. C. A quantidade de albumina marcada foi 0,6 %.

No tubo A colloquei 2 cc. d'essa urina, precipitada pelo acido trichloracetico.

No tubo B, derramei 2 cc. d'outra urina, em que verificára a presença de albumina e precipitei-a com a mesma quantidade do mesmo reactivo.

Buscando a igualdade de illuminação nos dous semi-circulos, quando esta foi alcançada, E era igual a 4 e $E^1 = 6$.

Applicando a formula,

$$P^1 = \frac{0,6 \times 4}{6} = 0,4$$

Logo, segundo o dado do nephelometro, a quantidade de albumina contida na segunda urina era 0,4 %.

Levando um maior volume d'esta urina ao albuminometro de *Aufrecht*, este marcou 0,4 na sua escala.

Não me restou, pois, mais duvida de que o aparelho construido dava medidas exactas.

IV

Aplicações á clinica

As dosagens nephelometricas têm larga applicação na clinica.

Repito que são necessarias varias condições physicas e chemicas (gráu de concentração dos reactivos, reacção do soluto, temperatura e volume d'elle, etc.) — para obter-se uma bôa dosagem. Faça-se, tambem, varios ensaios e tire-se a média dos resultados dados.

As soluções mui differentes do soluto-tipo são difficilmente comparadas e não se deve, quando o estalão marca 30 mm. (no aparelho grande de *Duboscq*) — tentar fazer as leituras ábaixo de 18 mm., ou na visinhança de 45 mm., salvo se nos contentarmos com valores approximados. Outra difficuldade está em determinar o reactivo adequado, capaz de precipitar a substancia em exame, fornecendo a turvação a medir.

Uma das applicações da nephelometria consiste em distinguir os exsudatos dos transudatos, mediante a dosagem da albumina. Com effeito, no exsudato a percentagem da albumina raramente é menor de 6 %, emquanto que no transudato a sua maior proporção é de 5 %.

Pelo mesmo methodo, poderemos avaliar o gráu d'inflammação das meninges, fazendo a dosagem da albumina no liquido cephalo-rachiano, normalmente sem ella.

Se no mesmo liquido pesquisar-se a proporção de chloruretos, poderemos descobrir uma meningite tuberculosa caracterisada, segundo *Widal*, pela diminuição d'el-

les, normalmente existentes na proporção de mais, ou menos 6 ‰.

Na dosagem das substancias mineraes e organicas da urina, temos larga applicação da nephelometria.

O *phosphoro* está n'ella, no estado de phosphatos e a sua dosagem se exprime em $H^3 PO^4$. A cifra d'este, multiplicada por 2, fornece a proporção de phosphatos.

Meigs (1) usa, para a dosagem nephelometrica do phosphoro, como reactivo precipitante, o molybdato de estrychnina. Para obtel-o, são misturados, em determinadas proporções, o molybdato de sodio, agua e acido chlohydrico e a esta solução é accrescentada uma pequena quantidade de solução saturada de sulfato d'estrychnina.

A dosagem do *chloro*, no estado de chloreto de sodio, faz-se juntando á solução algumas gottas de acido azotico e outras poucas gottas de nitrato de prata.

Para o *enxofre*, no estado de sulfatos de cal, magnesia, potassio e sodio, acidifica-se o soluto com algumas gottas de acido acetico, para impedir a precipitação dos phosphatos. O soluto é, então, precipitado por um excesso da solução a 1 ‰ de chloreto de baryo.

As *pseudo-albuminas* pódem ser dosadas, mediante a turvação obtida pelo sulfato de ammonio crystallizado.

— Na dosagem da acetona urinaria, *Marriot* usa, como precipitante, o cyanureto duplo de mercurio e prata.

A *albumina*, tem como precipitantes o calor, o acido azotico ao terço, o reactivo picro-citrico e o acido acetico com 6 a 8 gottas de ferro-cyanureto de potassio.

Os *pigmentos biliares* são dosados pela reacção de *Grimbert*, que causa turvação pelo emprego do chloreto de baryo a 10 %.

1) — *J. of. B. C.* — Vol. 36, Nov. 1918.

A turvação para dosar as albumoses se obtém com o ferrocyanoreto acetico.

O *sangue*, como já descrevi, é medido pelo reactivo de *Florence*.

No que respeita á dosagem dos elementos do sangue, ou do seu sôro, a nephelometria tambem é usada. As revistas norte-americanas descrevem, seguidamente, dosagens praticadas por tal methodo.

Assim, *Bloor* dosou o phosphoro e a lecithina do sangue.

Curtman e *Lehrman* o acido urico do mesmo liquido, alcalinisando a solução com carbonato de sodio e precipitando-a pelo acetato de nickel.

No leite, *Denis* e *Minot* dosaram, pelo nephelometro, o cholesterol.

Não tentarei descrever, aqui, todas as applicações da nephelometria. A escasseza de tempo não me permittiu senão a verificação do bom funcionamento do aparelho construido, cabendo aos vindouros o seu uso mais aprofundado, mais da competencia da chimica biologica.

lume do mesmo reactivo na solução a dosar, para um mesmo volume de ambos os solutos.

A nephelometria está sujeita a erros, quando praticada pelos que perderam a faculdade de distinguir as côres. Os resultados variam tambem com o gráu de agudeza visual do observador e com a pratica, mais ou menos antiga, que elle tem do methodo.

Ponto essencial em nephelometria é que, tanto a solução-tipo como a que está em exame, tenham aspecto muito semelhante, para que os dous semi-discos não fiquem muito desigualmente illuminados, sendo então, impossivel igualar-lhes a illumination, percorrendo em vão toda a altura da escala.

Assim, se tomarmos para padrão, na dosagem da albumina urinaria, 0,25 centigrs. de «albumen ovi siccum», dissolvidos em 250 cc. de agua distillada (sol, a 1^o/₁₀₀), impossivel nos será, com tal estalão, dosar a albumina existente na urina. Precipitadas ambas as soluções por um igual numero de gottas de acido trichloracetico e levadas aos tubos nephelometricos, nunca conseguiremos igual luz nos dous semi-discos: o correspondente á solução-modelo terá sempre a côr branca-leitosa, surgindo o outro semidisco com a côr da urina.

Para estabelecer, pois, estalões na dosagem de elementos urinarios, faz-se o soluto-tipo, dissolvendo a substancia em estudo n'uma urina em que se verificou, préviamente, pelos reactivos adequados, a ausencia da referida substancia.

Se o corpo que queremos dosar existe em grande proporção no liquido em exame, fazemos com este varias diluições, procedendo, no fim do exame nephelometrico, ao calculo que nos indicará a quantidade de substancia existente na solução primitiva. Como exemplo simples: para dosar *traços carregados* de albumina n'uma urina,

diluíamos 5 cc. d'esta urina em igual volume d'outra urina em que não ha essa substancia. Dosada ao nephelometro esta diluição, o numero obtido para resultado é multiplicado por 2, pois a quantidade de albumina existente na urina em exame foi examinada n'um volume duplo do que ella occupa na urina primitiva.

Não bastando esta diluição, juntemos um igual volume (10 cc.) de urina sem albumina. A cifra então resultante deverá ser multiplicada por 4. E assim por deante, até obtermos uma solução que contenha pequena proporção de albumina.

III

Prova do nephelometro

Para verificar se o aparelho por mim creado funcionava perfeita e correctamente, submetti-o ás seguintes provas, nas quaes a substancia, tanto do estalão como do soluto a examinar, foi préviamente dosada, pelos outros methodos de dosagem usados. Nas provas seguintes, A representa o tubo-testemunha e B o que é cheio do soluto cuja proporção de substancia queremos dosar. Ambos os tubos, como já mencionei, têm a capacidade de 2cc.

I

Dosados os chloruretos da urina de E. G., pelo methodo de *Charpentier-Volhard*, encontrei o valor 5,013 $\frac{0}{100}$ para o chlorureto de sodio, que estava, portanto, em proporção inferior á normal.

D'essa urina, usei 10 cc., acrescentando a ella X gottas de acido azotico e V gottas de nitrato de prata. Obtive um precipitado de chlorureto de prata, com uma turvação branca-leitosa.

Lançando em ambos os tubos nephelometricos 2 cc. da solução, quando os indices marcaram 3 na escala, a illuminação dos dous semi-discos foi identica, o que provava conterem ambos os tubos a mesma proporção de chlorureto.

II

Pesados, na balança decimal, 0,25 centigrammos de «albumen ovi siccum», foram elles dissolvidos em 250 cc. de urina sem albumina (sol. 1^o/₁₀₀).

No tubo A colloquei 2 cc. d'esse soluto-estalão. Para o tubo B, usei 2 cc. da solução formada por 2 cc. de liquido-testemunha + 2 cc. de urina isempta de albumina, i. é., 2 cc. d'urina contendo $\frac{1}{2}$ ^o/₁₀₀ d'albumina.

Precipitada a albumina pelo acido trichloracetico, a espessura necessaria para A foi igual a 10 e para B = 20.

Logo, á quantidade de substancia, contida em B, é:

$$P^1 = \frac{10}{20} = 0,5 \text{ por mil}$$

III

Dissolvi 0,10 centesimos de cc. de sangue de carneiro em 100 cc. de urina (sol. 1^o/₁₀₀). O tubo A recebeu 2 cc. d'essa solução, i. é., 0,002 millesimos de cc. de sangue, depois da turvação obtida com o reactivo de *Florence* (1)

O tubo B recebeu a metade (2 cc.) do volume formado por 2 cc. da solução-modelo + 2 cc. de urina sem sangue, i. é., recebeu 0,001 millesimo de cc. de sangue, precipitado pela mesma quantidade do reactivo. Para este tubo, quando o disco surgiu igualmente illuminado em suas duas metades, E' foi igual a 6 na escala.

Para o tubo A, E marcou 3.

$$\text{Logo } P^1 = \frac{3}{6} \text{ 0,5 por 1000 cc de}$$

1) Reactivo de *Florence*: Pyridina 50 g. — Alcool 50 g. — chloroformio 50 g. — Acetato de zinco 7,5 g.

IV

Para fazer a contra-prova do aparelho, procedi da seguinte maneira:

Dosei, no albuminometro de *Aufrecht*, a albumina da urina de A. C. A quantidade de albumina marcada foi 0,6 %.

No tubo A colloquei 2 cc. d'essa urina, precipitada pelo acido trichloracetico.

No tubo B, derramei 2 cc. d'outra urina, em que verificára a presença de albumina e precipitei-a com a mesma quantidade do mesmo reactivo.

Buscando a igualdade de illumination nos dous semi-circulos, quando esta foi alcançada, E era igual a 4 e E¹ = 6.

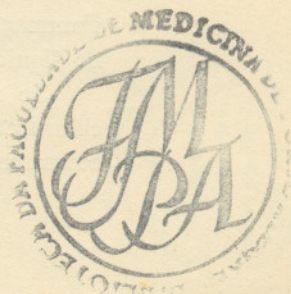
Applicando a formula,

$$P^1 = \frac{0,6 \times 4}{6} = 0,4$$

Logo, segundo o dado do nephelometro, a quantidade de albumina contida na segunda urina era 0,4 %.

Levando um maior volume d'esta urina ao albuminometro de *Aufrecht*, este marcou 0,4 na sua escala.

Não me restou, pois, mais duvida de que o aparelho construido dava medidas exactas.



IV

Applicações á clinica

As dosagens nephelometricas têm larga applicação na clinica.

Repito que são necessarias varias condições physicas e chimicas (gráu de concentração dos reactivos, reacção do soluto, temperatura e volume d'elle, etc.) — para obter-se uma bôa dosagem. Faça-se, tambem, varios ensaios e tire-se a média dos resultados dados.

As soluções mui differentes do soluto-tipo são difficilmente comparadas e não se deve, quando o estalão marca 30 mm. (no aparelho grande de *Duboscq*) — tentar fazer as leituras ábaixo de 18 mm., ou na visinhança de 45 mm., salvo se nos contentarmos com valores approximados. Outra difficuldade está em determinar o reactivo adequado, capaz de precipitar a substancia em exame, fornecendo a turvação a medir.

Uma das applicações da nephelometria consiste em distinguir os exsudatos dos transudatos, mediante a dosagem da albumina. Com effeito, no exsudato a percentagem da albumina raramente é menor de 6 %, emquanto que no transudato a sua maior proporção é de 5 %.

Pelo mesmo methodo, poderemos avaliar o gráu d'inflammação das meninges, fazendo a dosagem da albumina no liquido cephalo-rachiano, normalmente sem ella.

Se no mesmo liquido pesquisar-se a proporção de chloruretos, poderemos descobrir uma meningite tuberculosa caracterizada, segundo *Widal*, pela diminuição d'el-

les, normalmente existentes na proporção de mais, ou menos 6 ‰.

Na dosagem das substancias mineraes e organicas da urina, temos larga applicação da nephelometria.

O *phosphoro* está n'ella, no estado de phosphatos e a sua dosagem se exprime em $H^3 PO^4$. A cifra d'este, multiplicada por 2, fornece a proporção de phosphatos.

Meigs (1) usa, para a dosagem nephelometrica do phosphoro, como reactivo precipitante, o molybdato de estrychnina. Para obtel-o, são misturados, em determinadas proporções, o molybdato de sodio, agua e acido chlohydrico e a esta solução é acrescentada uma pequena quantidade de solução saturada de sulfato d'estrychnina.

A dosagem do *chloro*, no estado de chloreto de sodio, faz-se juntando á solução algumas gottas de acido azotico e outras poucas gottas de nitrato de prata.

Para o *enxofre*, no estado de sulfatos de cal, magnesia, potassio e sodio, acidifica-se o soluto com algumas gottas de acido acetico, para impedir a precipitação dos phosphatos. O soluto é, então, precipitado por um excesso da solução a 1 ‰ de chloreto de baryo.

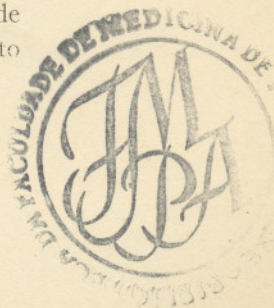
As *pseudo-albuminas* pôdem ser dosadas, mediante a turvação obtida pelo sulfato de ammonio crystallizado.

— Na dosagem da acetona urinaria, *Marriot* usa, como precipitante, o cyanureto duplo de mercurio e prata.

A *albumina*, tem como precipitantes o calor, o acido azotico ao terço, o reactivo picro-citrico e o acido acetico com 6 a 8 gottas de ferro-cyanureto de potassio.

Os *pigmentos biliares* são dosados pela reacção de *Grimbert*, que causa turvação pelo emprego do chloreto de baryo a 10 %.

1) — *J. of. B. C.* — Vol. 36, Nov. 1918.



A turvação para dosar as albumoses se obtém com o ferrocyanoreto acetico.

O *sangue*, como já descrevi, é medido pelo reactivo de *Florence*.

No que respeita á dosagem dos elementos do sangue, ou do seu sôro, a nephelometria tambem é usada. As revistas norte-americanas descrevem, seguidamente, dosagens praticadas por tal methodo.

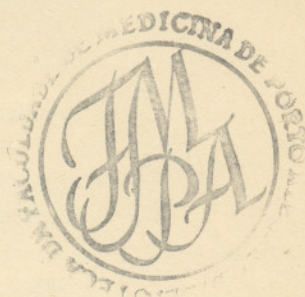
Assim, *Bloor* dosou o phosphoro e a lecithina do sangue.

Curtman e *Lehrman* o acido urico do mesmo liquido, alcalinisando a solução com carbonato de sodio e precipitando-a pelo acetato de nickel.

No leite, *Denis* e *Minot* dosaram, pelo nephelometro, o cholesterol.

Não tentarei descrever, aqui, todas as applicações da nephelometria. A escasseza de tempo não me permittiu senão a verificação do bom funcionamento do aparelho construido, cabendo aos vindouros o seu uso mais aprofundado, mais da competencia da chimica biologica.

Conclusões



— A idéa de *Bloor*, com o fim de transformar o colorimento de *Duboscq* em um nephelometro, é realisavel e foi por mim effectuada.

— Na prova e contra-prova a que sujeitei o apparelho, convenci-me do bom funcionamento d'elle.

— Varias condições são necessarias para uma boa nephelometria: semelhança dos dous solutos, para que se obtenha igual illuminação dos dous semi-circulos; exclusão completa da luz, que só deve cahir sobre os dous tubos nephelometricos; elevação ou abaixamento da ocular, até ser bem focado o disco luminoso; igual volume de precipitante, tanto para o padrão, como para a solução a examinar; igualdade de temperatura em ambos os solutos; igualdade de volume nas soluções dos dous tubos nephelometricos; conhecer-se a densidade da substancia em exame, (1) porque as alturas de tubo que devem ser expostadas á luz, até obter-se igual illuminação dos semi-discos — são inversamente proporcionaes ás densidades, quando estas são differentes; o grau de concentração dos reactivos; a reacção dos solutos, etc.

— Deve fazer-se varias medidas da solução a examinar, estabelecendo a sua média.

— Se o corpo em exame está em forte proporção no liquido, procede-se a varias diluições, fazendo-se o calculo em relação ás mudanças de volume.

1) — *Meigs* — J. of B. C. — Vol. 36, Nov. 1918

— A dosagem nephelometrica é superior ao methodo ponderal, pelos motivos allegados.

— Só a longa pratica poderá fornecer resultados rapidos e exactos, pois o coefficente pessoal tem largo valor no methodo.

— Não julgo a nephelometria superior á colorimetria. Cada um destes methodos tem as suas vantagens e desvantagens, sendo o pratico levado a adoptar ora um, ora outro.
