

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 29

Novembro—1934

Fasciculo 1

Glutathion no sangue humano normal (*)

por

GILBERTO G. VILLELA e J. GOMES CAMPOS ¹

RESUMO HISTORICO

A theoria de Wieland considera como « acceptores de hydrogenio » certas substancias facilmente reductiveis, capazes de retirar o H das oxydações metabolicas. Deve-se a Hopkins uma importante contribuição ao estudo das oxydações physiologicas. Isolou elle em 1921 dos tecidos animaes e vegetaes um « acceptor de hydrogenio » ao qual deu o nome de glutathion. A descoberta de Hopkins teve por inicio os trabalhos de Rey-Palhaide apresentados á Academia de Sciencias de Paris em 1888. Este pesquisador foi quem primeiro observou a propriedade que possuiam as cellulas de levêdo e seus extractos aquosos de reduzir o S á frio. Mostrou depois que muitos tecidos possuiam a mesma propriedade e n'uma série de communicações manteve sempre o ponto de vista de que o H labil existente nas cellulas gozava de importante função respiratoria. Rey-Palhaide propoz o nome de « *philothion* » a essa substancia que a principio suppoz carregar o H labil; mais tarde em seus ultimos trabalhos considerava o *philothion* como um « hydrureto de albumina » e só após a publicação de Heffter (1908) acceitou a existencia do H labil em grupos sulfidrylicos (—SH).

(*) Recebido para publicação a 26 de Junho de 1934.

¹ Trabalho feito no Instituto Oswaldo Cruz e no Laboratorio da Clinica Dermatologica da Faculdade de Medicina (Serviço do Prof. Rabello).

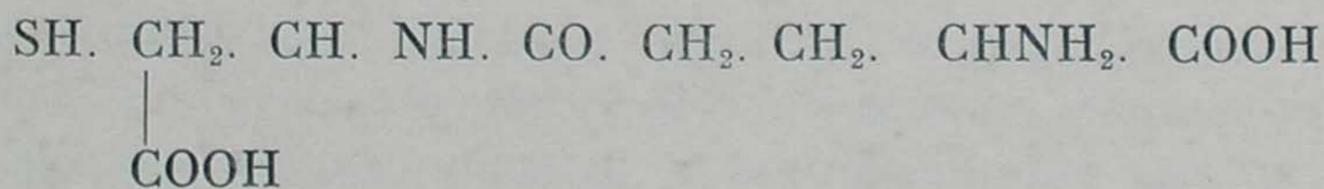
Depois que Mörner empregou a reacção do nitroprussiato de sodio para a identificação da cysteina, numerosos pesquisadores (Gola, Buffer, Heffter, Arnold), mostraram a existencia do grupo sulfidrylico nos tecidos animaes e vegetaes. Heffter em 1908 applicou a reacção do nitroprussiato a um grande numero de tecidos e extractos, obtendo reacção positiva em muitos casos.

Arnold, em 1911, mostrou que o test de nitroprussiato, em condições apropriadas, podia ser considerado positivo para todos os tecidos organizados. Para este autor o grupo S.H pertencia á cysteina e fazia parte da constituição primaria de toda cellula.

Heffter, apesar de não ter conhecimento da natureza chimica da substancia, formulou hypotheses muito suggestivas. Assim, julgava que o grupo — S H pelo seu hydrogerio era responsavel pelas propriedades reductoras do protoplasma como tambem indirectamente pelas oxydações da cellula, passando da fórmula sulfidrylica — S H para a disulfurica S — S. Heffter chamou a attenção para o facto de que a cysteina podia ser reduzida para cystina sob a acção do sulfito de sodio e suggeriu a ideia de que na cellula, alguma substancia semelhante ao sulfito age como um «acceptor» do oxygenio da mollecula da agua, libertando o hydrogenio que vae reduzir o grupo disulfurico. As hypotheses de Heffter não passaram, entretanto, do dominio theorico.

Em 1921, Hopkins, procurando determinar a natureza chimica do constituinte a que Rey-Palhaide chamou de «philothion», fez um exhaustivo estudo em fracções dos extractos tissulares e conseguiu isolar do levêdo, do musculo e do figado de mamíferos, a substancia responsavel pela reacção do nitroprussiato, que foi por elle considerada como um dipeptide do acido glutamico e cysteina, propondo por isso o nome de *glutathion*.

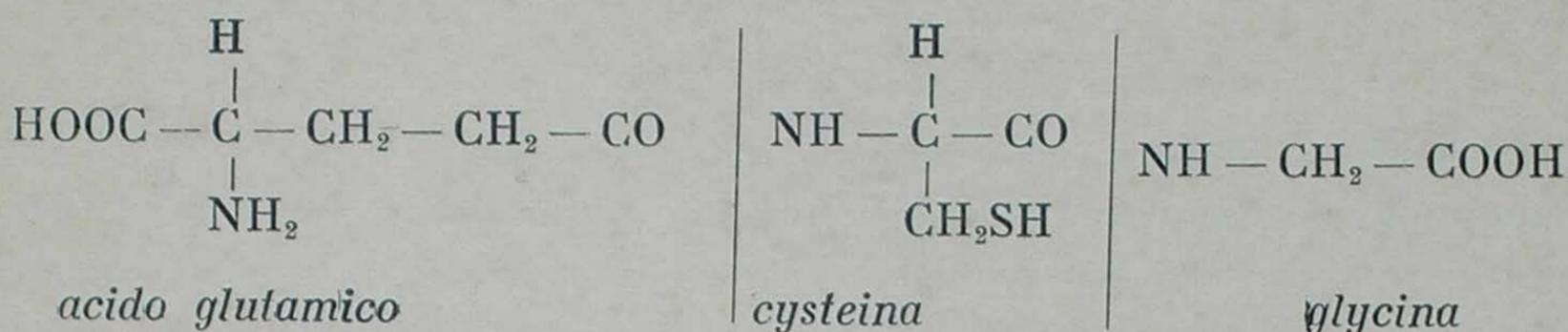
Stewart e Tunncliffe (Biochem. Journ. 19, 207 (1925), synthetisaram o dipeptide e confirmaram a formula:



Entretanto, Hunter e Eagles (1) mostraram que o glutathion era um tripeptide visto os preparados synthetizados por elles terem evidenciado sempre mais Nitrogenio e menos Enxofre do que a formula indicava.

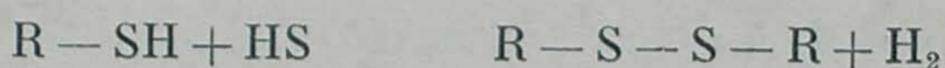
Hopkins (2), reinvestigando o problema confirmou o trabalho de Hunter e Eagles, conseguindo acido glutamico e glycina por meio da hydrolyse.

Kendall, McKensie e Mason (3) publicaram resultados semelhantes. Kendall em trabalho posterior (4) mostrou que no glutathion o acido glutamico está unido á cysteina e esta ao grupo aminado da glycina, devendo sua formula ser assim representada:



O glutathion é portanto segundo a moderna nomenclatura a glutamil-cysteinil-glycina.

Existe sob duas formas: oxydada e reduzida, sendo a oxydação e reduccção resultante da reacção reversivel do grupo =SH.



As reacções que caracterizam o glutathion são reacções qualitativas communs aos compostos sulfidrylados.

- 1) — Aquecido em meio alcalino com plumbito de sodio, ou com hydrato de chumbo, forma um precipitado de sulfureto de chumbo.
- 2) — Reacção do nitroprussiato de sodio. 2 a 3 cc. da sol. sulfidrylica mais algumas gottas da solução fresca de nitroprussiato a 5 % mais 1 a 2 gottas de ammoniaco concentrado (Hopkins) = coloração vermelha que desaparece rapidamente.
- 3) — Modificação de Rothera. Consiste na addição prévia de sulfato de ammonio em concentração elevada intensificando a reacção.

A reacção do nitroprussiato só põe em evidencia as fórmulas reduzidas.

- 4) — Reacção de Walker. Substituir o alkali pela solução de cyaneto de potassio a 10 %. Solução a estudar mais gottas de nitroprussiato a 10 %, mais gottas de cyaneto de potassio até a alcalinidade. As formas reduzidas dão immediatamente uma côr vermelha magenta; as fórmulas oxydadas dão a mesma coloração com certa demora.
- 5) — Reacção com o acido phospho-tungstico. Tanto o glutathion como a cysteina reduzem em solução alcalina o reactivo de Folin-Wu e dão uma coloração azul que foi o ponto de partida de um methodo colorimetrico para a cysteina.

- 6) — A reacção especifica da cysteina (Sullivan) com o 1-2 naphto-quinona-sulfonato de sodio não dá nenhuma coloração com o glutathion (Hess).

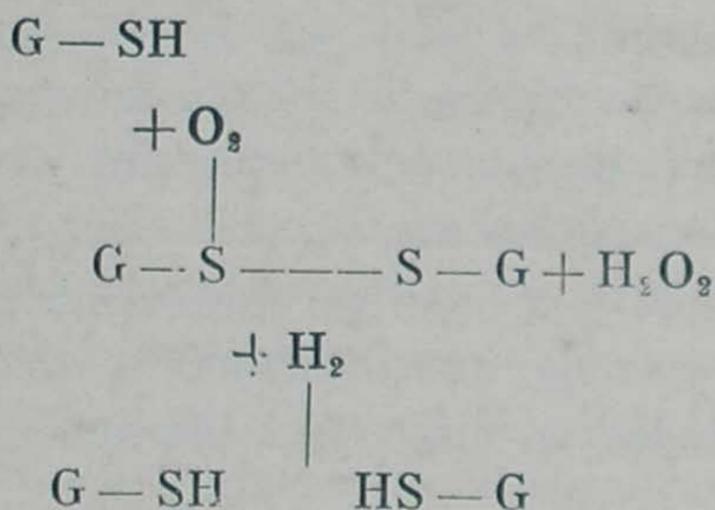
*Importancia do glutathion e seu modo de acção nas
oxydações physiologicas*

Devido a presença do systema reversivel $H_2 + S - S \rightleftharpoons S + SH$ o tripeptide de Hopkins assumiu enorme importancia no campo das oxydações e reduções em biologia. Bem cedo se verificou que a reacção do meio exerce uma grande influencia sobre esse equilibrio. Na zona de pH visinha da neutralidade o glutathion é facilmente autoxydavel, ao contrario a autoxydação é pequena em zonas de pH distantes de um e outro lado da neutralidade.

O glutathion dos tecidos existente sob a fórmula —SH é particularmente autoxydavel devido ao pH tissular.

A faculdade de transformação do glutathion reduzido em glutathion oxydado é grande. Observa-se tambem facilmente a transformação da fórmula oxydada reduzida sob a acção dos assucars reductores e mesmo do cyanete de potassio.

O modo de acção do glutathion nas oxydações physiologicas pode ser assim eschematicamente representado:



O glutathion age pois como um acceptor de hydrogenio, removendo este elemento dos tecidos e passando-o ao oxygenio. O peroxydo de hydrogenio que se forma é decomposto em agua e hydrogenio pela catalase tissular que assume ahi uma funcção protectora e definitiva (Bodansky).

EXISTENCIA NOS TECIDOS:

Em 1925, Tunncliffe (5) introduziu um methodo de dosagem do glutathion baseado no facto de ser o grupo —SH passivel de oxydação pelo iodo para o grupo S—S e relativo portanto ao conteúdo

de glutathion dos tecidos. Surgiram em seguida varios trabalhos mostrando a porcentagem do glutathion nos tecidos vivos.

Blanchetière e Binet (6) avaliaram systematicamente para o cão o teôr em glutathion reduzido (G. SH) de varios órgãos, publicando os resultados seguintes:

	G. S. H.	em mgrs. 0/0
Figado	245	396
Pulmão	74	87
Baço	193	215
Rim	264	306
Musculos	67	81
Coração	103	136
M. recto	58	—
² Suprarenal	374	585
Thyreoide	143	293
Pancreas	201	234
Ovario	143	324
Testiculo	255	266

As vistas se dirigiram depois para o sangue que nas primeiras pesquisas não foi encontrado, (Hopkins, Tunncliffe), embora os primitivos resultados de Arnold accusassem a presença da reacção do nitroprussiato nos filtrados de globulos livres de protides.

Pouco tempo após a publicação do methodo de dosagem por Tunncliffe, Holden isolou 50 mgrs. de glutathion de 1 litro de sangue de carneiro e achou que o glutathion se achava inteiramente unido aos globulos, não existindo no plasma (7). Thompson e Voegtlin dosando-o no sangue de varios animaes verificaram tambem a sua ausencia absoluta no sôro (8):

	Sangue Total		Globulos		Sòro	
	G—SH	GT	G—SH	GT	G—SH	GT
Cão	20	24	55	79	0	0
Rato	22	30	46	53	0	0
Porco	31	39	70	93	0	0
Boi	35	39	73	81	0	0
Vitello	36	38	66	74	0	0
Carneiro	38	41	86	100	0	0
Coelho	49	54	104	114	0	0
Cobayo	49	28	143	151	0	0

² Nota-se que a suprarenal é particularmente rica em G. S. H o que fez Loeper attribuir-lhe papel no metabolismo do enxofre.

Varios outros autores (Brown e Kolker, Hunter e Eagles, Harding e Cary, Uyei, Blanchetière, Mélon e Binet) investigaram o conteúdo de glutathion do sangue de varios mammiferos.

GLUTATHION NO SANGUE HUMANO NORMAL

A primeira determinação no sangue humano normal, foi feita por Turner que encontrou, usando o methodo de Tunncliffe, a média de 107 mgrs. por 100 cc. de globulos.

Benedict e Newton (9), em 18 casos, usando um methodo de dosagem baseado na reacção do nitroprussiato de sodio deram a média de 55 mgrs. por 100 cc. de sangue total. Zunz encontrou 44.45 de glutathion reduzido e 55.66 de glutathion oxydado (10). Schelling (11) empregando o methodo colorimetrico pela redução do ferrocyaneto, proposto por Mason, dá a média de 22 mgrs. Uyei encontrou 50 mgrs. (12). Hess obteve como média para a fórmula reduzida 59 mgrs. e 62 mgrs. para a fórmula oxydada (13). Este autor empregou em suas determinações o methodo iodometrico de Okuda usado para a dosagem de cysteina. Mais recentemente Woodward e Fry empregando um novo desproteinisante e usando a iodometria encontraram a média de 34 mgrs. para G—SH e 3 a 11 mgrs. para G—SS (14).

CAUSAS QUE INFLUEM NA DETERMINAÇÃO DO GLUTATHION NO SANGUE

O desaccordo entre os valores mencionados deve-se á pouca precisão das technicas empregadas e sobretudo á pluralidade dos reactivos desproteinisantes que não permitem sempre obter filtrados quantitativamente homogeneos. Em primeiro plano está a acidez final dos filtrados que varia de um processo para outro, influenciando enormemente nos resultados, devido á maior ou menor autoxydação processada. Desde que se trabalhe em condições especiaes de pH, tanto nas titulações iodometricas como nos methodos colorimetricos os resultados podem ser comparaveis.

Na obtenção do filtrado de sangue para a determinação do glutathion dois cuidados devem ser rigirosamente observados:

1. — Que o glutathion seja totalmente extrahido dos globulos.
2. — Que não se perca o glutathion pela autoxydação.

O filtrado de acido trichloro-acetico usado primitivamente por Tunncliffe teve por fim evitar a autoxydação. Realmente, devido a grande acidez final do filtrado a autoxydação que se observa é pequena. Segundo

Bierich e Kalbe a autoxydação é de 5 % em 3 horas, desaparecendo esse erro quando se faz a titulação imediatamente (15). Entretanto, o glutathion não é totalmente extrahido pelo acido trichloro-acetico conforme verificaram Gabbe (16), Gulland e Peters (17) e Schelling (11), não podendo portanto ser esse acido empregado como desproteinizante nas determinações do glutathion. Usando-se o methodo de Folin-Wu, a extracção do glutathion é total conforme se tem verificado pela recuperação do tripeptide adicionado ao sangue antes da desproteinização. Quando se emprega na diluição de 1:10 o pH final é de 5.5 sendo insufficiente para prevenir a autoxydação que exige uma acidez mais baixa.

Schelling empregando nas dosagens do glutathion o methodo colorimetrico de Mason propoz a modificação da diluição de 1:5 ficando o pH em 4.9. Essa acidez é ainda insufficiente para prevenir a perda dos grupos —SH e por isso Mason em seus ultimos trabalhos propoz uma modificação (18), augmentando a acidez de modo a evitar a autoxydação.

Hess, em trabalho publicado em 1929, aconselha a desproteinização pelo acido tungstico-molybdico (technica de Benedict e Newton). A extracção do glutathion é total e a autoxydação é nulla, só se processando ao fim de algumas horas. O pH do filtrado é de 3,5.

Mais recentemente, Woodward e Fry propuzeram após repetidos ensaios, um novo desproteinizante para a determinação do glutathion, fornecendo um filtrado que satisfaz inteiramente as duas condições acima mencionadas. Esses autores verificaram que usando-se o acido sulfo-salicylico o glutathion é totalmente extrahido e o filtrado possui uma acidez sufficiente para evitar qualquer autoxydação. O pH final é de 2.0. O glutathion adicionado ao sangue, antes da precipitação dos protides é recuperado na porcentagem de 97 a 100 %.

Sangue	G-S H adicionado mgrs. o/o	G. SH do sangue mgrs. o/o	G. SH total encontrado mgrs. o/o	G. SH recuperado mgrs. o/o
1	100	39.7	138.5	99.8
			136.5	97.1
2	100	29.8	129.5	99.7
			130.1	100.3

Determinando o glutathion por varios processos concluimos pela maior sensibilidade da technica de Woodward e Fry. Ensaíamos detalhadamente a technica aconselhada por esses autores, bem como a de Okuda-Hess, ambos titrimetricos baseados na oxydação da fórmula —SH.

Todos os autores estão accordes que sómente a thioneina, que existe

em pequena quantidade no sangue, pode exercer influencia sobre a titulação iodometrica do glutathion devido á existencia na molecula do agrupamento S-H. Em pH extremamente acido, a thioneina é levemente oxydada pelo iodo; ao contrario em pH proximo da neutralidade a oxydabilidade é augmentada. Em presença do glutathion sempre em pH acido a oxydação da thioneina se processa e sua maior ou menor oxydação é funcção da quantidade das duas substancias presentes. Woodward e Fry mostraram que o glutathion exerce uma acção catalytica sobre a oxydação da thioneina. Quando a relação entre o glutathion e a thioneina é de 1:1 esta se oxyda pelo iodo na proporção de 48 %, quando a relação é de 2:1 a percentagem sóbe a 56 %.

Sendo a relação de 6:1, isto é, proximamente da que existe entre esses dois compostos no sangue normal, a thioneina é oxydada pelo iodo na proporção de 60 %. Tomando como média 5 mgrs. de thioneina presente em 100 cc. de sangue o erro nas determinações do glutathion, pela technica de Woodward-Fry é sómente de 3 mgrs. %.

O teor de thioneina no sangue é de 5 a 7,5 mgrs. para 100 cc. (Hunter, Behre e Benedict) para a fórmula S—S com o iodeto e iodato de potassio em solução acida (19). Fundamentam-se as technicas de dosagem do glutathion no processo iodometrico de Okuda empregado no Hygiene Laboratory de Washington para a determinação da cystina e de cysteina. Hess foi quem primeiro empregou o methodo de Okuda na determinação do glutathion. Requer as seguintes soluções:

- 1) — Iodato de potassio m/1.200 (dissolver 0,5350 mgrs. de iodato de potassio em 3 litros de HCl a 2 %).
- 2) — Acido chlorhydrico a 4 %.
- 3) — Iodato de potassio aquoso a 5 %.

GLUTATHION REDUZIDO

Technica: — 10 cc. do filtrado isento de protides obtido pelo methodo Benedict-Newton são postos exactamente a 2 % com HCl. Adicionam-se 2.5 cc. de iodeto de potassio a 5 % e mais 2.5 cc. de HCl a 4 %.

A solução é então esfriada a 20° C. e titulada com a solução de Iodato m/1.200 com microbureta de precisão, até a coloração amarella persistente por 1 minuto.

Durante a titulação a temperatura não deve ultrapassar a 20° C. Este detalhe é importante podendo decorrer grandes erros se não fôr bem observado (King e Lucas) (20).

Por meio deste methodo só se determina o glutathion reduzido.

Para determinar a fórmula oxydada é necessario reduzir o grupo G—S para —SH.

A technica é a seguinte:

GLUTATHION TOTAL:

Technica: — Para 10 cc. do filtrado adiciona-se 1 cc. de HCl concentrado a alguns decigrammos de Zn em pó. Aquece-se até a fervura durante 10'. Filtra-se e lava-se quantitativamente. Ajusta-se a acidez do filtrado para 2% com HCl concentrado. Adiciona-se 2.5 cc. de iodeto de potassio a 5% e 2.5 cc. de HCl a 4%. Esfria-se a 20° C. e titula-se com o Iodato. m/1.200.

Calculo: — Sabendo-se que 6,48 cc. da solução de iodato de potassio m/1.200 equivalem a 10 mgrs. de glutathion reduzido basta dividir o numero de cc. gastos de iodato na titulação pelo factor 6.48 para se ter em mgrs. a quantidade de glutathion para 100 cc. de sangue. Subtrahindo-se o glutathion total (G. T.) do glutathion reduzido (G—SH) tem-se o glutathion oxydado (G—GS).

O methodo de Woodward-Fry é mais simples, consistindo na titulação de 10 cc. do filtrado livre de protides (a custa da solução molar de acido sulfosalicylico) pelo iodato de potassio 0,001 N em presença de excesso de iodeto a 20° C. usando-se a gomma de amido como indicador interno.

A medida que o iodato é gottejado da microbureta o iodo se liberta e é inteiramente utilizado na oxydação do glutathion reduzido. Quando todos os grupamentos sulfidrylicos (—SH) são transformados em grupamentos disulfuricos (G—S) a menor quantidade de iodo em excesso dará com a gomma de amido a côr azul caracteristica que indica o final da titulação.

O processo de Woodward e Fry offerece as seguintes vantagens sobre o de Okuda-Hess e o de Mason (pelo ferricyaneto):

- 1) — Menor quantidade de sangue empregada nas determinações (3 cc. de sangue dão bastante filtrado para determinar o glutathion oxydado e reduzido).
- 2) — O filtrado é obtido mais rapidamente (com 1/2 hora após punção venosa já se pôde effectuar a primeira titulação).
- 3) — Não ha autoxydação sinão ao cabo de 24 horas, podendo-se repetir a titulação nas 8 primeiras horas com resultados sempre comparaveis.
- 4) — O uso de indicador interno facilita muito a apreciação do ponto optimo da titulação.

O methodo requer as seguintes soluções:

- 1) — Solução molar de acido sulfosalicylico (22 mgrs. para 100 cc.).
Pesar 25 grs. por ser o acido muito hygroskopico.
- 2) — Solução de acido sulfosalicylico a 4 %. (Tomar 45.6 cc. da solução molar e diluir para 250 cc.).
- 3) — Iodeto de potassio a 5 %.
- 4) — Gomma de amido a 1 %.
- 5) — Iodato de potassio 0,001 N (contendo 2 % de acido sulfosalicylico).

Desproteízação

Technica: — Tomar 1 volume de sangue oxalatado em proporções optimas (0,01 cc. de $K_2C_2O_4$ a 30 % (3 mgrs.) para 1 cc. de sangue) e hemolizar em 8 volumes de agua distillada, em Erlenmeyer de 50 cc.

2) — Após 5 a 10 minutos juntar (gotta a gotta) lentamente, sob constante agitação do balão, 1 volume da solução molar de acido sulfosalicylico.

Misturar e filtrar em papel de filtro sêcco (tomando-se 3 cc. de sangue obtem-se 22 a 25 cc. do filtrado sufficientes para a determinação das formas oxydada e reduzida). O filtrado apresenta o pH de 2.0.

Titulação:

- 1) — Tomar 10 cc. do filtrado em balão Erlenmeyer de 50 cc.
- 2) — Addicionar 2.5 cc. de acido sulfosalicylico a 4 %.
- 3) — Addicionar 2.5 de iodeto de potassio a 5 % isento de I_2 .
- 4) — Addicionar 2 gottas de gomma de amido a 1 %.
- 5) — Titular (usando microbureta) pelo iodato de potassio 0,001 N (feito a 2 % de acido sulfosalicylico para manter a acidez desejada) até o apparecimento de uma leve côr azul persistente. Durante a titulação o frasco é conservado dentro de um becker com agua na temperatura de 20° C. o que não só mantem fixa a temperatura propria para a titulação, como tambem fornece um fundo claro que facilita muito a observação do optimo de viragem (côr azul). Aliás a viragem final é muito rapida e sensivel, bastando ás vezes fracções de gotta para se dar como terminada a titulação.

Calculo (para 10 cc. do filtrado):

$$\frac{\text{cc. gottas de } 0,001 \text{ N KIO}_3}{3.26} \times 100 = \text{mgrs. de GSH para } 100 \text{ cc.}$$

de sangue. O valor 3.26 representa o titulo theorico para 1 mgr. de glutathion. O titulo theorico é obtido pela titulação de 1 mgr. de glutathion puro em 10 cc. de acido sulfosalicylico a 2 %.

A technica para o glutathion total é a seguinte:

- 1) — Tomar 12 ou 15 cc. restantes do filtrado.
- 2) — Adicionar 30 a 40 centgrs. de Zn. em pó e deixar reagir durante 20'.
- 3) — Filtrar em papel de filtro secco para remover o excesso de Zn (o filtrado apresenta o pH de 2.2 após esse tratamento).
- 4) — Tomar 10 cc. em balão Erlenmeyer de 50 cc.
- 5) — Adicionar 2.5 cc. da solução de acido sulfosalicylico a 4 %.
- 6) — Adicionar 2.5 de iodeto de K a 5 %.
- 7) — Adicionar 2 gottas de gomma de amido a 1 %.
- 8) — Titular pelo iodato de potassio 0.001 N na temperatura de 20°C. 20° C.

$$\text{Calculo: — } \frac{\text{cc. gastos de } 0,001 \text{ N}}{3.26} \times 100 = \text{mgrs. GT \%}$$

Subtrahindo do Glutathion Total (GT) o glutathion reduzido (G—SH) tem-se o glutathion oxydado (G—SS).

Dando preferencia á technica de Woodward e Fry para as nossas determinações procuramos verificar cuidadosamente o pH final dos filtrados isentos de proteínas fornecidos pelo acido sulfosalicylico. Elles se mantêm sempre em torno de pH 2.0. As titulações successivas feitas no mesmo filtrado após 2 h., 8 h. e 24 horas nos mostraram resultados sempre comparaveis ao da titulação immediata conforme se vê no quadro abaixo.

Os nossos resultados mostram-se em perfeito accordo com os de Woodward e Fry. Estes autores igualmente observaram sómente pequena auto-oxydação em 24 horas.

Auto-oxidação do glutathion no filtrado de sangue obtido pelo acido sulfosalicylico

Sangue	mgrs. o/o	Titl. immediato	c/2 hs.	c/8 hs.	c/24 hs.
I	G. SH	26.2	25.9	25.8	20.4
	G. T	31.9	31.5	31.8	31.8
	G. SS	5.7	5.6	5.7	11.4
II	G. SH	27.6	28.0	27.8	21.9
	G. T	39.3	39.5	39.6	39.7
	G. SS	12.2	11.5	11.8	17.8
III	G. SH	30.3	30.6	31.0	24.1
	G. T	39.5	39.0	38.9	39.3
	G. SS	9.2	9.6	7.9	15.2
IV	G. SH	32.1	31.8	32.0	26.6
	G. T	41.4	42.0	41.9	41.3
	G. SS	9.3	10.2	9.9	14.7

As dosagens do glutathion no sangue de 30 individuos normaes de ambos os sexos nos forneceram os seguintes valores médios:

HOMENS:	G. SH.....	27.0 mgrs. o/o
	G. T.....	33.6 « «
	G. S. S.....	6.6 « «
MULHERES:	G. SH.....	28.4 « «
	G. T.....	36.2 « «
	G. SS.....	7.8 « «

O sangue foi sempre retirado pela manhã por punção venosa e em seguida oxalatado na proporção de 0.01 cc. da $K_2C_2O_4$ a 30% para cada 1 cc. de sangue. A desproteinização feita immediatamente permittiu sempre realizar a titulação no prazo de 1/2 hora após a retirada do sangue. Observando cuidadosamente a titulação na temperatura de 20° C. e trabalhando com pipetas e microburetas rigorosamente calibradas, conseguimos valores que se enquadram perfeitamente dentro dos limites obtidos por Woodward e Fry.

Conforme se vê no quadro da pag. 13 os individuos do sexo feminino apresentaram valores superiores em todas as fracções do glutathion.

Os resultados foram sempre mais altos quando determinados pela technica de Hess.

Glutathion em 100 cc. de sangue oxalatado (21)

H O M E N S mgrs. o/o					M U L H E R E S mgrs. o/o				
N.	Idade	G. SH	G. SS	G. T.	N.	Idade	G. SH	G. SS	GT
1	23	17	2	19	1	22	16	12	28
2	18	21	6	27	2	32	23	5	28
3	33	21	3	24	3	24	24	3	27
4	22	25	5	30	4	38	25	6	31
5	26	24	2	26	5	21	26	6	32
6	28	26	4	30	6	25	28	9	35
7	21	26	5	31	7	40	28	12	40
8	21	26	6	32	8	32	28	12	40
9	53	27	12	39	9	29	28	2	30
10	29	29	12	41	10	44	29	9	38
11	24	30	9	39	11	19	30	6	36
12	23	30	8	38	12	32	30	5	35
13	29	31	10	41	13	50	37	13	50
14	19	36	4	40	14	33	38	6	44
15	50	37	11	48	15	19	38	11	49
Media:	—	27	6.6	33.6	—	—	28.4	7.8	36.2

Introduzindo no final da titulação o emprego do indicador interno em vez da simples coloração pelo iodeto, conseguimos valores sempre mais baixos o que prova que a sensibilidade do methodo por nós assim modificado é bem maior do que a da technica original de Hess.

O R I G I N A L

INDICADOR INTERNO

Sangue	G. SH.	G. T.	G. SS.	G. SH.	G. T.	G. SS
1	48	58	10	33	46	13
2	52	56	4	35	52	17
3	54	58	4	38	40	18
4	49	54	5	29	38	9
5	44	49	5	28	38	10
6	40	43	3	25	32	7
Media	47.8	53	5.1	31.3	41	12.3

Empregando a technica de Okuda-Hess e usando a gomma dee amido como indicador interno a média encontrada para o sangue dos 30 individuos normaes foi bastante mais baixa que a mencionada por Hess, porém ainda superior a que encontramos pela technica de Woodward e Fry, conforme se vê no quadro que segue.

Observações para o sangue de 30 individuos normaes:

Glutathion em mgr. para 100 cc. de sangue

Pela technica de Woodward-Fry			Pela technica de Okuda-Hess modificada	
HOMENS:	G. S. H.	27		34.6
	G. SS	6.6		11.2
	G. T.	33.6		45.9
MULHERES:	G. S. H.	28.4		34.4
	G. SS	7.8		12.6
	G. T.	36.2		46.0

Para o sangue de animaes (cobayo, coelho, gato) encontramos os seguintes valores:

Glutathion em 100 cc. de sangue oxalatado

Technicas de:

	OKUDA-HESS modificada			WOODWARD-FRY		
	G. SH	G. T.	G. SS	G. SH	G. T	G. SS
Cobayo	23	32	9	17.7	23	5.3
Gato	38.4	46.4	8	22.4	28	6.4
Coelho	24	36	12	19.2	26	7.2

Procuramos tambem verificar como se comportava o glutathion na *hyperglobulia* e na *acrocyanose*³. Na *hyperglobulia* o augmento do glutathion é consideravel devido a maior quantidade de globulos vermelhos porque são justamente os que contêm o glutathion pois o sôro é isento delle. No caso presente o doente apresentava 10 milhões de hematias por mm³.

Glutathion em mgrs. para 100 cc.

ACROCYANOSE	S. arterial	G. SH.....	19
		G. SS.....	2
		G. T.....	21
	S. venoso	G. SH.....	14
		G. SS.....	4
		G. T.....	18
HYPERGLOBULLA	G. SH.....	55.8	
	G. SS.....	10.7	
	G. T.....	66.5	

³ O caso de *hyperglobulia* foi a nós cedido pelo Dr. Jayr Fontes a quem muito agradecemos. O de *acrocyanose* devemos á gentileza do Prof. Eurico Villela que nos forneceu o sangue bem como a observação clinica. A doente se achava internada na 12^a. Enfermaria do Hospital S. Francisco de Assis.

O teor de G. SH no sangue arterial se mostrou superior ao do sangue venoso, o que está em perfeito accordo com as observações de Blanchetière, Mélon e Binet na asphyxia experimental do cão (22).

CONCLUSÕES:

- 1.) — Empregaram-se as technicas de Woodward e Fry e de Okuda-Hess na dosagem do glutathion do sangue normal.
- 2.) — O emprego da technica de Woodward e Fry offerece vantagens em relação ás demais existentes para a determinação do G. S. H.
- 3.) — Modificando-se o processo de Okuda-Hess pelo emprego de indicador interno favorece-se a leitura do ponto de viragem e por conseguinte augmenta-se a precisão da technica.
- 4.) — As médias obtidas para o sangue normal pela technica de Woodward-Fry foram para os individuos do sexo masculino de 27 mgrs. (G. S. H.), 6,6 (G. S. S.) e 33,6 mgrs. (G. T.), e para os do sexo feminino de 28,4 mgrs. (G. S. H.), 7,8 mgrs. (G. S. S.) e 36,2 mgrs. (G. T.).
- 5.) — A autoxydação do glutathion no filtrado obtido pelo acido sulfosalicylico só é apreciavel após 24 hs. Nas oito primeiras horas não ha nenhuma autoxydação.
- 6.) — Na hyperglobulia o glutathion do sangue augmenta por causa da maior quantidade de hematias. Na acrocyanose o sangue arterial é mais rico nesse composto do que o venoso estando em accordo com o que observaram Blanchetière, Mélon e Binet na asphyxia experimental do cão.

BIBLIOGRAPHIA

- 1) HUNTER & EAGLES—*Bioch. Jour.*, vol. 72, 147, 1927.
- 2) HOPKINS—*Bioch. Jour.*, vol. 84, 269, 1929.
- 3) KENDALL, MCKENZIE & MASON—*Bioch. Jour.*, vol. 84, 657, 1929.
- 4) KENDALL—*Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, vol. 4 359, 1929.
- 5) TUNNICLIFFE—*Bioch. Jour.*, vol. 19, 194, 1925.
- 6) BLANCHETIERE & BINET—*C. R. Soc. Biol.*, vol. 97, 1049, 1927.
- 7) HOLDEN—*Bioch. Jour.*, vol. 19, 727, 1925.
- 8) THOMPSON & VOEGTLIN—*Jour. Biol. Chem.*, vol. 17, 197, 1926.
- 9) BENEDICT & NEWTON—The use of molybdic acid as a precipitant of blood proteins. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 82, 1929; pag. 5.
- 10) ZUNZ—*Recherches sur la teneur du sang en glutathion.*—*Arch. Int. Physiol.*, vol. 35, 65, 1932.
- 11) SCHELLING—A study of blood glutathione. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 97, 17, 1932.

- 12) UYEI—The glutathione content of animal tissues with special referente to tuberculosis. *Jour. of Inf. Dis.*, vol. 39, p. 73, 1926.
 - 13) HESS—The determination of glutathione with special reference to human blood. *Jour. Wash. Acad. Sc.*, vol. 19, p. 419, 1929.
 - 14) WOODWARD & FRY—*Jour. Biol. Chem.*, vol. 97, p. 465, 1932.
 - 15) BIERICH & KALBE—*Heit. Physiol. Chem.*, vol. 175, p. 115, 1928.
 - 16) GABBE—*Klin. Woch.*, 8, p. 2077, 1929.
 - 17) GULLAND & PETERS—*Bioch. Jour.*, vol. 24, p. 91, 1930.
 - 18) MASON—*Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, vol. 6, 168, 1931.
 - 19) BEHRE & BENEDICT—*Journ. Biol. Chem.*, vol. 82, p. 11, 1929.
 - 20) KING & LUCAS—*Bioch. Zeit.*, vol. 235, p. 66, 1931.
 - 21) VILLELA G. G. & GOMES CAMPOS—Glutathion du sang humain normal — *C. R. Soc. Biol.*, t. 115, p. 83, 1933.
 - 22) BLANCHETIERE, MÉLON & BINET—Catalysateurs cellulaires. — *Jour. de Phys. et de Path. Général.* 1928.
-