

# Lactacidemia - Métodos de dosagem do Ácido Lático

por

Maria Isabel Mello

(Com três figuras no texto)

O ácido lático é um produto intermediário no metabolismo dos hidratos de carbono. O teor deste ácido no sangue do indivíduo em repouso, corresponde a um equilíbrio entre a formação do ácido lático pela glicolise sanguínea, oxigenação dos pulmões e glicogenolise hepática e muscular. O rompimento deste equilíbrio provoca oscilações na lactacidemia. A determinação do ácido lático no sangue é importante, entretanto, oferece sérias dificuldades. Numerosos autores têm procurado removê-las, empregando as mais variadas técnicas para a obtenção de valores exatos. O ácido lático pode ser dosado sob a forma de lactato, ácido fórmico, aldeído acético, monóxido e dióxido de carbono, empregando-se para determiná-lo, técnicas gravimétricas, titulométricas, gasométricas e colorimétricas. Passaremos rapidamente em revista as principais técnicas :

## *Método gravimétrico*

Foi empregado por FLECHTER e HOPKINS para a dosagem do ácido lático nos músculos e aplicado por WOLF (46) ao sangue. Baseia-se este método na separação do ácido lático das substâncias interferentes e sua conversão subsequente em lactato pelo aquecimento com óxido ou carbonato de zinco. A pesada do lactato obtido, cuja pureza se determina pela análise elementar, dá valores exatos. Esta técnica é precisa, porém, muitíssimo demorada e exige grande quantidade de material (50 a 100 ml de sangue).

## *Método titulométrico*

O método titulométrico tem por origem o processo de BOAS (4) para a dosagem do ácido lático no suco gástrico. O ácido lático aquecido com uma substância oxidante forte, desdobra-se em aldeído acético e ácido fórmico,



que por sua vez, é oxidado pelo iodo produzindo iodofórmio o qual se titula por uma solução de iodo 0,1N, equivalendo 1 ml da solução gasta, a 0,3mg de ácido lático.

Trabalho do laboratório de Bioquímica, da Divisão de Química e Farmacologia, Chefe: Dr. Gilberto G. Villela.

\* Recebido para publicação a 27 de agosto e dado à publicidade em agosto de 1943.

JERUSALÉM (29), FÜRTH (21), FÜRTH e CHARNASS (22), modificaram a técnica de BOAS, empregando ao invés da titulação direta do iôdo combinado ao ácido fórmico, a dosagem iodométrica do aldeído acético oxidado pelo permanganato de potássio e combinado ao bisulfito. FRIES (19) aplicou ao sangue a técnica de FÜRTH e CHARNASS. RIPPER (41) e CLAUSEN (7), modificaram a técnica de titulação. Os agentes oxidantes empregados na técnica original têm também sido substituídos ou acrescentados. Assim JERVELL (30) usou o bicromato de potássio como agente oxidante, GORDON e QUASTEL (24) e WINNICK (45), o sulfato cérico, enquanto FRIEDMAN (16), FRIEDMAN e GREASER (18), FRIEDMAN, COTTONIO e SHAFFER (15) e FRIEDMAN e KENDALL (17), ao permanganato de potássio empregado por FÜRTH e CHARNASS, adicionaram o sulfato de manganês em proporções diferentes. Segundo FRIEDMAN e GRAESER, o máximo de produção de aldeído acético obtém-se quando se usam soluções muito diluídas do agente oxidante e alta concentração do sulfato de manganês. Donde se deduz, que as condições necessárias para a produção máxima do aldeído são aquelas que tendem a reduzir o potencial de oxidação do agente oxidante.

Os métodos titulométricos só oferecem resultados satisfatórios quando os fatores que concorrem para oxidação do ácido láctico em aldeído acético, (concentração do agente oxidante, acidez da solução, concentração do sulfato de manganês, temperatura e tempo de reação, arejamento, concentração do bisulfito e pureza dos reativos) são levados em consideração.

## QUADRO I

## Principais modificações sofridas pela técnica titulométrica

AUTOR	ANO	DESPROTEINIZANTE	AGENTE OXIDANTE	TITULAÇÃO
Furth e Charnass (22)....	1910		KMnO <sub>4</sub> .....	Excesso do bisulfito titulado pelo iôdo.
Fries (19).....	1911			
Ripper (41).....	1911			
Clausen (7).....	1922	Folin-Van Slyke.....	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> cu KMnO <sub>4</sub> .....	Bisulfito combinado ao aldeído acético e titulado pelo tiosulfato.
Jerwell (30).....	1928	Folin-Van Slyke....	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .....	Bicromato não consumido titulado pelo tiosulfato
Friedman, Cottonio e Shaffer (15).....	1927	Folin.....	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + KMnO <sub>4</sub> + MnSO <sub>4</sub>	Bisulfito combinado titulado pelo iôdo.
Friedman e Kendall (17).	1929	Folin.....	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + KMnO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .	—
Friedman (16).....	1928	Folin.....	idem	—
Friedman e Graeser (18).	1933	Folin ou Somogyi....	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + KMnO <sub>4</sub> + MnSO <sub>4</sub>	—
Tanaka e Endo (43).....	1929	Alcool + carvão + éter.....	KMnO <sub>4</sub> .....	Titulação do bisulfito combinado pelo iôdo.
Gordon e Quastel (24)....	1938	Acido tricloracético.	Ce (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> .....	Bisulfito combinado pelo iôdo.
Winnick (45).....	1942	Somogyi.....	Ce (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em acido sulfúrico.....	Bisulfito combinado.

*Métodos gasométricos*

Os métodos gasométricos originaram-se da asserção de PELOUZE, que “o ácido láctico ou seus sais, quando aquecidos com cinco a seis vezes o seu peso em ácido sulfúrico, desprendem quantitativamente CO”.

HÜBNER (28) em 1903, e mais tarde MEISSNER (34), RONZONI e LAWRENCE (42) aplicaram o princípio de PELOUZE para o dosagem do ácido láctico nos diferentes tecidos. A reação obedece à seguinte equação:



donde uma molécula de CO desprendida corresponde a uma molécula de ácido láctico.

BAUMBERGER e FIELDS (3) ao invés do ácido sulfúrico a quente, oxidam o ácido láctico em meio ácido, pelo permanganato de potássio e sulfato de manganês, enquanto AVERY e HASTINGS (1) empregam para a oxidação, apenas permanganato de potássio em excesso, dando-se a transformação na temperatura ambiente. Uma molécula de ácido láctico desprende uma molécula de CO<sub>2</sub>. Determina-se no manômetro de VAN SLYKE e NEILL o CO<sub>2</sub> resultante da oxidação do ácido láctico.

O método gasométrico é bastante preciso, pois que o CO<sub>2</sub> formado, em presença do excesso de agente oxidante, não sofre oxidação ulterior o que permite a obtenção de valores quantitativos.

*Métodos colorimétricos*

Os métodos colorimétricos baseiam-se na observação de DENIGÈS : “o ácido láctico em presença do ácido sulfúrico concentrado e aquecido a 100° C, converte-se em aldeído acético e CO, dando desenvolvimento de côr com os alcalóides e particularmente com os fenóis” (9). Várias substâncias têm sido empregadas para a dosagem colorimétrica do ácido láctico.

FLETCHER e HOPKINS (14) usaram o tiofeno que dá uma coloração vermelha; CHELLE (6) a codeína (metilmorfina) que desenvolve uma côr amarela; HARROP (27) o guaiacol (metilcatecol) que produz uma reação rósea; MENDEL e GOLDSCHIEDER (37) o veratrol (éter-di-metil-pirocatecol), que determina uma coloração amarelo-avermelhada; DISCHE e LASZLO (10) a hidroquinona que provoca o desenvolvimento de côr alaranjada; MILLER e MUNTZ (38) o p-hidroxidifenil que determina a formação de uma tonalidade azul violeta intensa.

Dos métodos colorimétricos citados, os que oferecem melhores resultados, são os de MENDEL e GOLDSCHIEDER e de MILLER e MUNTZ.

Descreveremos das técnicas citadas, as de EDWARDS (11), de MENDEL e GOLDSCHIEDER e a de MILLER e MUNTZ, por nós modificadas em alguns pontos.

### *Técnica de Edwards — Modificada*

O aparelho empregado foi o modelo de WENDEL (44) adaptado por EDWARDS, ao qual acrescentamos uma placa porosa.

#### *Descrição do aparelho :*

O aparelho compõe-se de :

- 1) um frasco de reação (A) que deve ter 15 cm de altura e capacidade para 275 ml.
- 2) um reservatório (B) com rólha de vidro. A parte superior tem capacidade para 20 ml da sol. de permanganato. A parte inferior é afunilada e quase toca o fundo do frasco de reação ;
- 3) um condensador (C), com refrigeração de água;
- 4) um tubo (D) de absorção, medindo 4 cm de diâmetro por 8 cm de altura, onde o aldeído formado se combina ao bisulfito;
- 5) uma tórre de arejamento (E) que mede 40 cm de altura por 2 cm de diâmetro;
- 6) uma placa porosa de vidro (F) JENA G3, que se liga ao condensador por meio de um tubo de borracha (tripa de mico).

As gravuras 1 e 1-A mostram o aparelho armado e em detalhe :

#### *Princípio do método*

O filtrado contendo ácido láctico é acidificado e aquecido com substâncias oxidantes. O aldeído acético formado é destilado em baixa temperatura e recebido em um frasco contendo bisulfito. O aldeído combinado ao bisulfito titula-se pelo iôdo 0,005N.

#### *Método de colheita do material*

O ácido láctico pode ser determinado no sangue total, no plasma ou nos glóbulos. O sangue é retirado do indivíduo em jejum e em repouso de pelo menos  $\frac{1}{2}$  hora, e sem estase venosa. Emprega-se como anti-coagulante a heparina ou o liquoid "Roche". Devem ser evitados os anti-coagulantes sa-

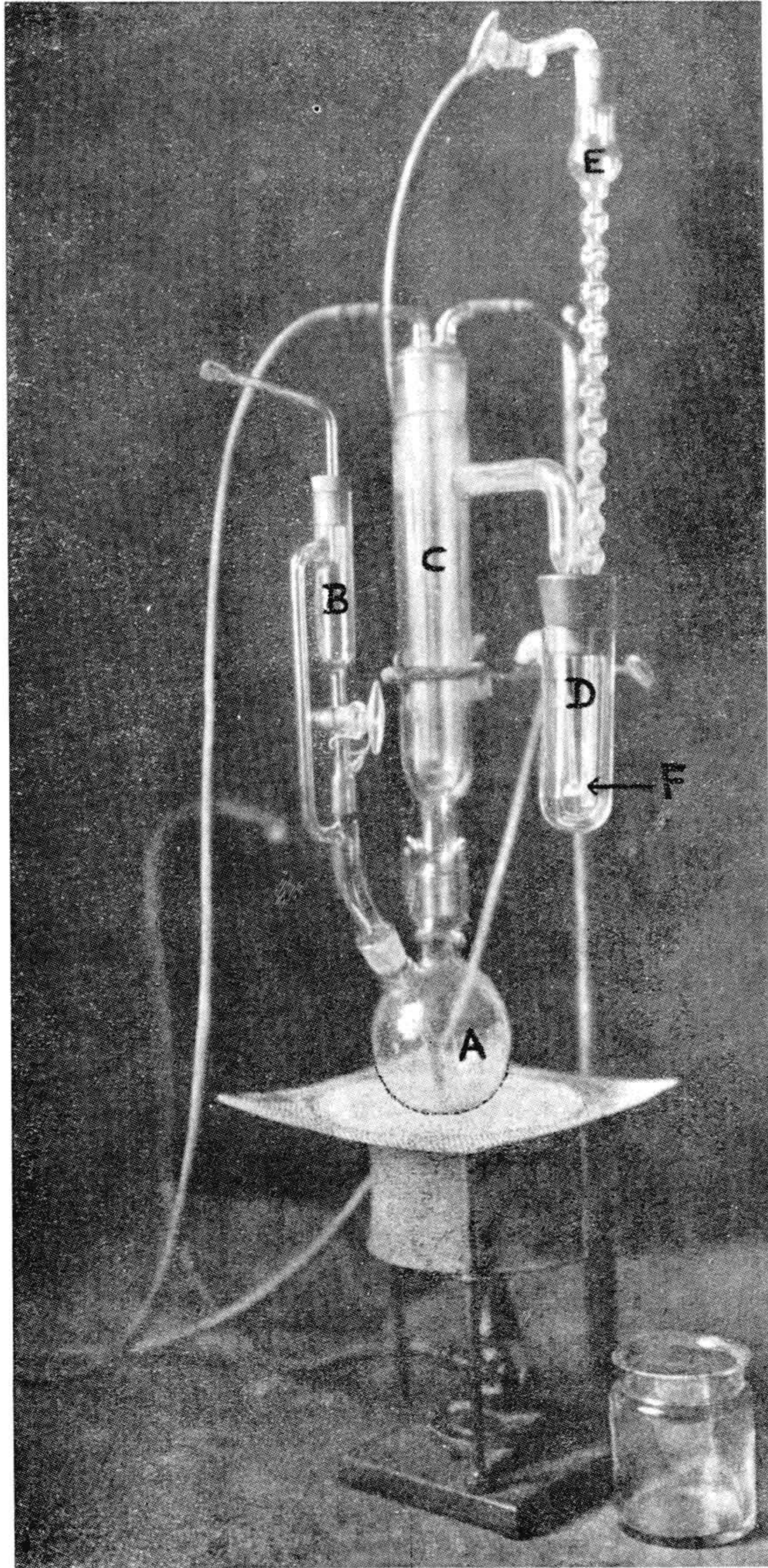


Fig. 1.

Aparêlho de Edwards

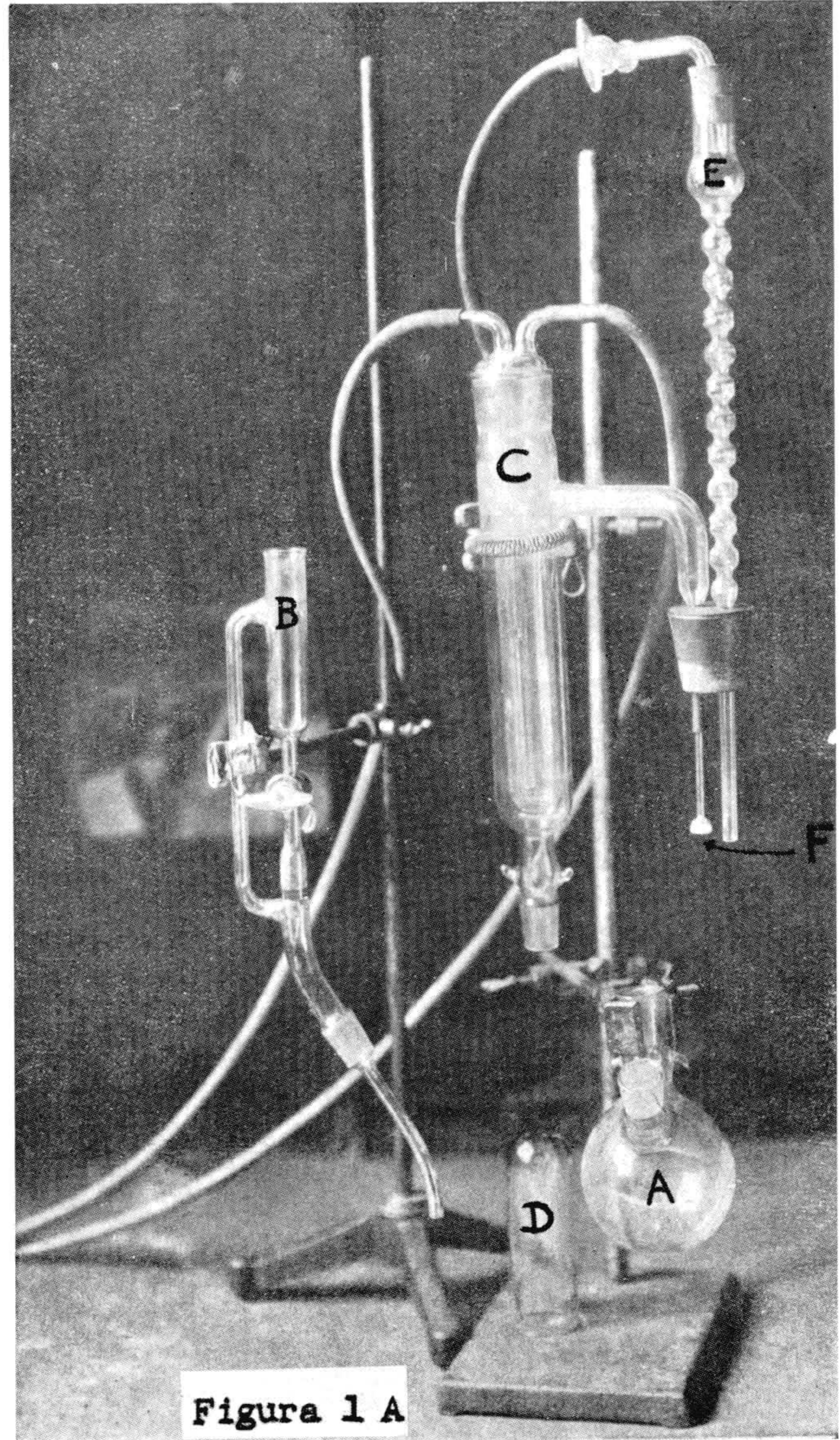


Figura 1 A

Fig. 1 A.

linos (WENDEL) (44). Pode-se também trabalhar com o sangue sem anti-coagulante quando se procede a hemolise e a desproteinização imediatas. Se não se puder efetuar a hemolise dentro de meia hora após a retirada do sangue, deve-se usar o liquoid adicionado de uma quantidade mínima de fluoreto de sódio para impedir a glicolise que irá dar valores mais altos. Para 10 ml de sangue, usam-se tubos contendo 0,3 ml de solução de liquoid (Roche) a 1% e 0,1 ml de fluoreto de sódio a 20 %. Os tubos são secados na estufa. O sangue é conservado na geladeira.

### REAGENTES

- 1 — solução de liquoid a 1 %
- 2 — solução de fluoreto de sódio a 20 %
- 3 — solução de tungstato de sódio a 10 %
- 4 — solução de sulfato de cobre a 7 %
- 5 — suspensão de hidróxido de cálcio a 14 %
- 6 — solução de sulfato de cobre a 15 %
- 7 — solução de ácido sulfúrico 10 N
- 8 — solução de sulfato de manganês a 10 %
- 9 — solução de permanganato de potásio 0,005 N
- 10 — solução de bisulfito de sódio a 5 % (preparado no momento de usar)
- 11 — solução de iodo 0,1N
- 12 — solução de tiosulfato de sódio 0,1N
- 13 — goma de amido a 1 %
- 14 — bicarbonato de sódio
- 15 — solução de lactato de lítio 0,1M (toma-se 1 molécula grama do lactato de lítio, ou sejam, 9,60 gr em 1.000 ml de ácido sulfúrico 0,2 N. A solução é muito estável (um ano) quando se conserva em vidro escuro e na geladeira).

### Técnica :

- 1 — Em um tubo de centrifugação, de 50 ml tomam-se 45 ml. de água destilada e 1 ml de sangue total e deixa-se hemolisar cinco minutos. (Para 1 ml de plasma tomam-se 17 ml de água destilada e para 1 ml de glóbulos, tomam-se 53 ml de água destilada).
- 2 — Ao sangue hemolizado adicionam-se, agitando, 1 ml de tungstato de sódio e 1 ml de sulfato de cobre a 7 %.
- 3 — Centrifuga-se cinco minutos ou filtra-se. (Quando se trabalha com quantidades pequenas de ácido láctico, deve-se ter a precaução de em-

- pregar papel de filtro tipo Schleicher e Schüll (faixa preta n. 585), lavado em água quente várias vezes e sêco na estufa. KERLY (31) verificou que o líquido de lavagem de um papel dêste tipo, com 12,5 centímetro de diâmetro produz 0,1 mg expresso em ácido láctico).
- 4 — O líquido sobrenadante é tratado com 1 ml da solução de sulfato de cobre a 15 %, mais 1 ml da suspensão do hidróxido de cálcio, técnica de SALKOWSKY (32). Pode-se ao invés da suspensão usar 1 gr de hidróxido de cálcio em pó. Agita-se bem e depois de  $\frac{1}{2}$  hora, centrifuga-se. Na superfície forma-se uma película de um precipitado muito fino que se retira sem rompe-la, com um bastão de vidro encurvado, ou uma espátula fina de vidro;
  - 5 — O centrifugado total e limpido é colocado no frasco A onde se pipetam: 5 ml de solução de ácido sulfúrico 10 N; 10 ml da solução de sulfato de manganês e  $\pm$  50 ml de água destilada.
  - 6 — No tubo D, pipetam-se 1 ml da solução de bisulfito de sódio a 5 % e 1 ml de água destilada, ou 2 ml de solução de bisulfito de sódio a 2,5 %. (A solução do bisulfito deve ser feita diariamente e conservada em vidro escuro e na geladeira). O tubo é mergulhado num frasco contendo água gelada.
  - 7 — Enche-se o reservatório B com uma solução de permanganato 0,005 N. Fecha-se com rôlha de borracha.
  - 8 — Ligam-se a água cuja temperatura deve ser de 15-20°C, e o bico Bunsen (micro).
  - 9 — To começar e ebulição ( $\pm$  10 minutos) faz-se passar o ar que acarreta as substâncias voláteis combináveis ao bisulfito; adapta-se o tubo D ao aparelho; liga-se o vácuo regulando assim como para o ar o número de bolhas; abre-se o reservatório de permanganato de modo que caia um gôta cada 10 a 15 segundos em média, até o aparecimento de uma coloração rósea que passa a castanho. Continua-se a gotejar lentamente até perfazer 15 minutos. O líquido apresenta então uma côr parda bem pronunciada. Fecha-se o reservatório de permanganato, desliga-se o fogo, abre-se totalmente o ar durante 10 minutos para que todo o aldeído acético passe para o tubo com o bisulfito e seja absorvido (GALVÃO) (32).
  - 10 — Desliga-se a água, o ar e o vácuo, lava-se a tôrre de absorção com pequenas porções de água destilada ( $\pm$  8 ml).
  - 11 — No tubo D conservado no vaso contendo água gelada procede-se a titulação, segundo CLAUSEN.

O bisulfito que ficou livre é oxidado para sulfato pela adição até ligeiro excesso de uma solução de iôdo 0,1 N. Emprega-se goma de

amido como indicador. A coloração azul é removida por uma gota de solução de bisulfito de sódio. Junta-se então uma solução de iodo 0,005 N até ligeiro reaparecimento do azul no líquido incolor.

- 12 — O bisulfito combinado ao aldeído é libertado por adição de mais ou menos 1 gr de  $\text{NaHCO}_3$ , quantidade suficiente para o desaparecimento da cor azul e decomposição do bisulfito combinado. O sulfito livre é titulado pelo iodo 0,005 N que se deixa cair de uma micro-bureta. Havendo dúvida sobre o fim da reação, adiciona-se mais bicarbonato. Persistindo a cor azul 15 segundos, é evidente que o fim da reação já se havia dado.

Faz-se concomitantemente uma prova em branco para obtenção de valores exatos.

$$\text{Cálculo} - \text{mg de ácido láctico em 10 ml} = \frac{0,45 \cdot N \cdot (A - B)}{V}$$

onde: N = normalidade de solução de iodo usada

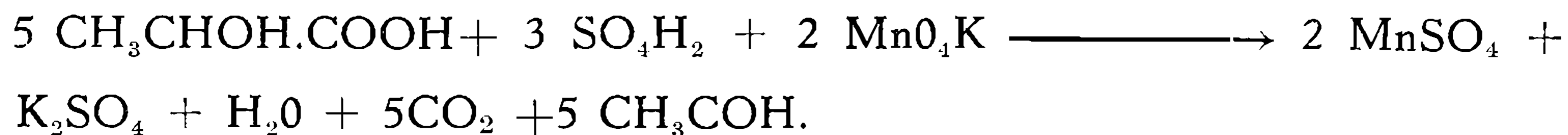
A = ml de solução de iodo gastos com o bisulfito combinado

B = ml de solução de iodo gastos na prova em branco

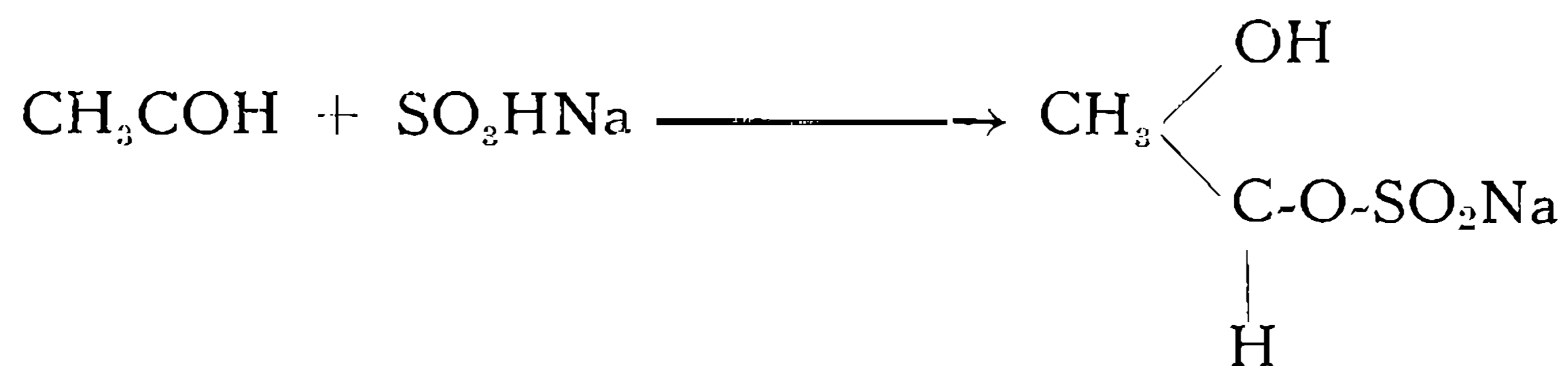
V = ml de sangue presentes na amostra.

Fator 0,45 (= 1 ml de uma solução normal de iodo equivale a 45 gr de ácido láctico por 1.000 ml).

Sabe-se que uma molécula de ácido láctico dá pela oxidação uma molécula de aldeído acético.



O aldeído acético formado, combina-se ao bisulfito dando etanol-sulfonato sódico.



onde, uma molécula de aldeído acético combinada ao bisulfito, fornece uma molécula de etanol sulfonato de sódio. Na decomposição deste, cada molécula dará uma de bisulfito que exige para sua oxidação, dois átomos de iodo (35).



Tendo o ácido láctico um pêso molecular de 90 e usando-se uma solução normal de iodo, 1 ml desta solução equivale a 45 grs. de ácido láctico para 1.000 ml de sangue, se se fizer a determinação em 1 ml de sangue.

*Detalhes. Anti-coagulantes :*

A hemolise do sangue, após a sua retirada, evita o emprego de anti-coagulantes e oferece resultados ótimos, quando se procede a desproteinição imediata. Sempre que possível, empregamos esta técnica.

No caso de trabalhar com anti-coagulantes, EDWARDS preconiza o uso de heparina. Dado o elevado preço de heparina, resolvemos estudar a influência dos outros anti-coagulantes e escolher aquele que oferecesse melhor resultado. O emprêgo de sais de sódio e potássio dão valores muito mais altos. Com o liquoid obtêm-se valores praticamente iguais àqueles obtidos com sangue hemolizado na hora. O fluoreto de sódio, quando adicionado ao tubo liquoidado, para evitar a glicolise, quase não altera os valores e impede também a transformação do ácido láctico em ácido pirúvico. Os resultados obtidos com os vários anti-coagulantes empregados, figuram no quadro abaixo :

QUADRO II

ANTI-COAGULANTES

Mg. de ácido láctico em 100 ml de sangue

N	SANGUE HEMOLIZADO	OXALATO DE POTÁSSIO	OXALATO DE SÓDIO	FLUCRETO DE SÓDIO	LIQUOID	LIQUOID + FLUORETO	OXALATO + FLUORETO
1	8,50	9,20	9,10	9,15	8,45	8,50	9,15
2	11,58	13,10	12,90	12,95	11,63	11,40	12,75
3	11,87	12,90	12,86	12,90	11,90	11,85	12,70

Em vista dos resultados obtidos, resolvemos empregar o liquoid adicionado de fluoreto. Para 10 ml de sangue usamos tubos contendo 0,3 ml de solução de liquoid a 1 % e 0,1 ml de fluoreto de sódio a 20 %.

*Preparação do lactado de lítio*

A técnica é a proposta por FRIEDMAN e GRAESER (18), que modificamos ligeiramente. O lactato de lítio foi preparado partindo-se de uma solução de carbonato de lítio puríssimo e ácido d-l-láctico puríssimo. Uma solução de ácido láctico a 50 %, é neutralizada por  $\pm 2$  grs de carbonato de lítio. Usa-se o vermelho fenol como indicador. Aquece-se a solução até evaporação quase

completa. Esfriam-se, lavam-se os cristais com álcool a 95 % ( $\pm$  250 ml). Concentra-se por destilação até 1/3 do volume. Deixa-se uma noite na geladeira. Os cristais são dissolvidos no álcool absoluto a quente. Deixa-se novamente cristalizar. Filtra-se no Buchner. Lavam-se os cristais 4 ou 5 vezes com álcool absoluto frio, filtra-se e seca-se no vácuo. O pó obtido é guardado em frascos escuros na geladeira. O lactado de lítio é o mais anidro dos lactatos.

### *Influência da temperatura, ar e vácuo*

#### *Temperatura :*

Na temperatura ambiente os resultados obtidos para um mesmo sangue variam muito. Para obtermos temperatura constante sem alterar o aparêlho de EDWARDS, mergulhamos o tubo D em um vaso contendo água cuja temperatura conservamos entre 18 a 20°C durante a destilação e a 4°C na titulação.

#### AR :

A regulação da entrada do ar é muito importante.

- 1 — Se a corrente for muito forte, o líquido do frasco A entrando em ebulição passa para o reservatório B, indo reduzir o permanganato;
- 2 — Sendo muito forte a corrente de ar, os vapores são acarretados rapidamente e a destilação é imperfeita para o tubo de absorção, D;
- 3 — Uma vez completados os 15 minutos de destilação e desligado o fogo, deve-se abrir totalmente o ar para que o aldeído acético destilado, passe todo para o tubo de absorção.

GALVÃO e PERREIRA sugerem que se deixe passar a corrente de ar durante 10 minutos para obtenção de rendimento máximo.

#### VÁCUO

O vácuo deve ser moderado :

- 2) para que a combinação seja perfeita e total;
- 2) para evitar a cristalização do bisulfito durante a destilação.

#### ÊRRO DO MÉTODO

Fizemos determinações comparativas da técnica modificada com a original. Os valores obtidos foram publicados em nota anterior (34).

A técnica modificada dá valores mais altos que a original. Obtivemos um erro médio de 0,71 % para a técnica original e 0,24 % com técnica modificada.

*Valores encontrados para o sangue humano normal*

Os valores encontrados por nós para o ácido láctico do sangue de indivíduos sádios e em repouso pela técnica por nós modificada, oscilaram entre 8,30 mg e 14,75 mg, dando-nos uma média de 9,25 mg. Os valores obtidos com sangue de indivíduos diabéticos, cancerosos, tuberculosos e com insuficiências cardíaca e de suprarenais, serão publicados em trabalho ulterior.

QUADRO III

Valores normais para o ácido láctico em mg. para 100 ml. de sangue encontrados com a técnica titulométrica.

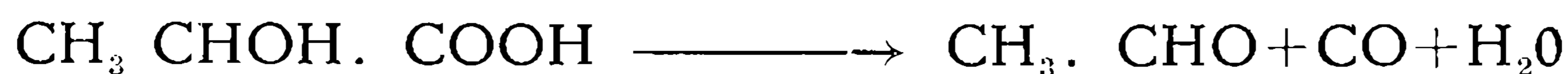
AUTOR	ANO	EM MG PARA 100 ml DE SANGUE		MÉDIA	TÉCNICA
		Min.	Máx.		
Fries (19) .....	1911	8	24	9,60	Fries (Ripper modificado)
Clausen (7) .....	1922	15	32	—	Clausen (Ripper modificado)
Killian (32) .....	1926	11	15	—	Clausen
Bokelmann (5) .....	1927	15,2	21,3	17,13	Clausen
Jerwell (30) .....	1928	20	30	—	Klaus-Hansen, modificado pelo autôr
Friedman e Graeser (18) .....	1933	5	20	—	Friedman e Graeser
Cook e Hurst (8) .....	1933	8,4	16,6	—	Friedman, Cotonio e Shaffer, modificado por Friedman e Kendall
Baisset, Bugnard e Rogeon (2) .....	1938	10	20	—	Friedman, Cotonio e Shaffer
Edwards (11) .....	1939	10	20	—	Edwards (Friedman, Cotonio e Shaffer)
Hallcock (26) .....	1938	10	20	13,9	Friedman, Cotonio e Shaffer
Mejia (35) .....	1939	9,5	19,1	12,5	Friedman, Cotonio e Shaffer
Mello (36) .....	1941	7,30	15,25	10,3	Mello (Edwards, modificado)
Winnick (45) .....	1942	10	25	—	Microdifusão

*Métodos colorimétricos*

Os métodos colorimétricos para a dosagem do ácido láctico, apresentam várias vantagens sobre o de titulação. Não exigem aparelhamento especial, os cuidados são menores, as causas de erro poucas e são de fácil execução. Porém a pesar de mais práticos e rápidos, os métodos colorimétricos só ultimamente estão sendo mais empregados na determinação do ácido láctico.

Várias têm sido as técnicas propostas. As principais acham-se reunidas no quadro IV.

Todas elas são baseadas na conversão do ácido láctico em aldeído acético, quando aquecido com ácido sulfúrico concentrado.



e desenvolvimento de côr quando em presença de determinados reagentes.

As técnicas de MENDEL e GOLDSCHIEDER e de MILLER e MUNTZ, foram por nós estudadas e modificadas em seus detalhes.

### *Técnica de Mendel e Goldscheider — Modificada*

#### PRINCÍPIO

As proteínas do sangue são precipitadas pela técnica de SOMOGYI (hidróxido de zinco) e o líquido resultante é tratado pela técnica de SALKOWSKY. O filtrado contendo ácido láctico e livre das substâncias interferentes, é aquecido com ácido sulfúrico concentrado e o aldeído formado produz com o veratrol uma coloração avermelhada que se lê no fotômetro de PULFRICH.

#### *Colheita do material*

O sangue é retirado observando-se todos os cuidados já descritos na técnica anterior.

#### *Reagentes necessários*

- 1 — Solução de sulfato de zinco 10 %;
- 2 — Solução de hidróxido de sódio — 0,5 N;
- 3 — ácido sulfúrico concentrado  $D = 1,84$  pro-análise.

O ácido sulfúrico deve ser examinado antes de se usar, tomando-se 3 ml de ácido sulfúrico e 0,1 ml da solução de veratrol a 0,125 %. Desenvolvendo-se coloração amarela, o ácido contém nitritos e nitratos, o que dará causa de erro. Tal ácido não poderá ser utilizado.

- 4 — Solução de veratrol (Kahlbaum) 0,125 % em álcool absoluto;
- 5 — Solução padrão de lactato de lítio (já descrita no método anterior).

#### TÉCNICA

##### *Desproteínização*

Toma-se em tubo de centrifugação 1 ml de sangue total que se hemoliza em 7 ml de água. Pipetam-se lentamente e agitando 1 ml de solução de sulfato de zinco e 1 ml de solução de hidróxido de sódio, centrifuga-se. O líquido sobrenadante é tratado com 1 ml de solução de sulfato de cobre e 1 ml da suspensão de hidróxido de cálcio. Deixa-se  $\frac{1}{2}$  hora agitando o tubo de quando em vez. Centrifuga-se. Retira-se com bastão de vidro fino a película que se forma na superfície do líquido.

QUADRO IV

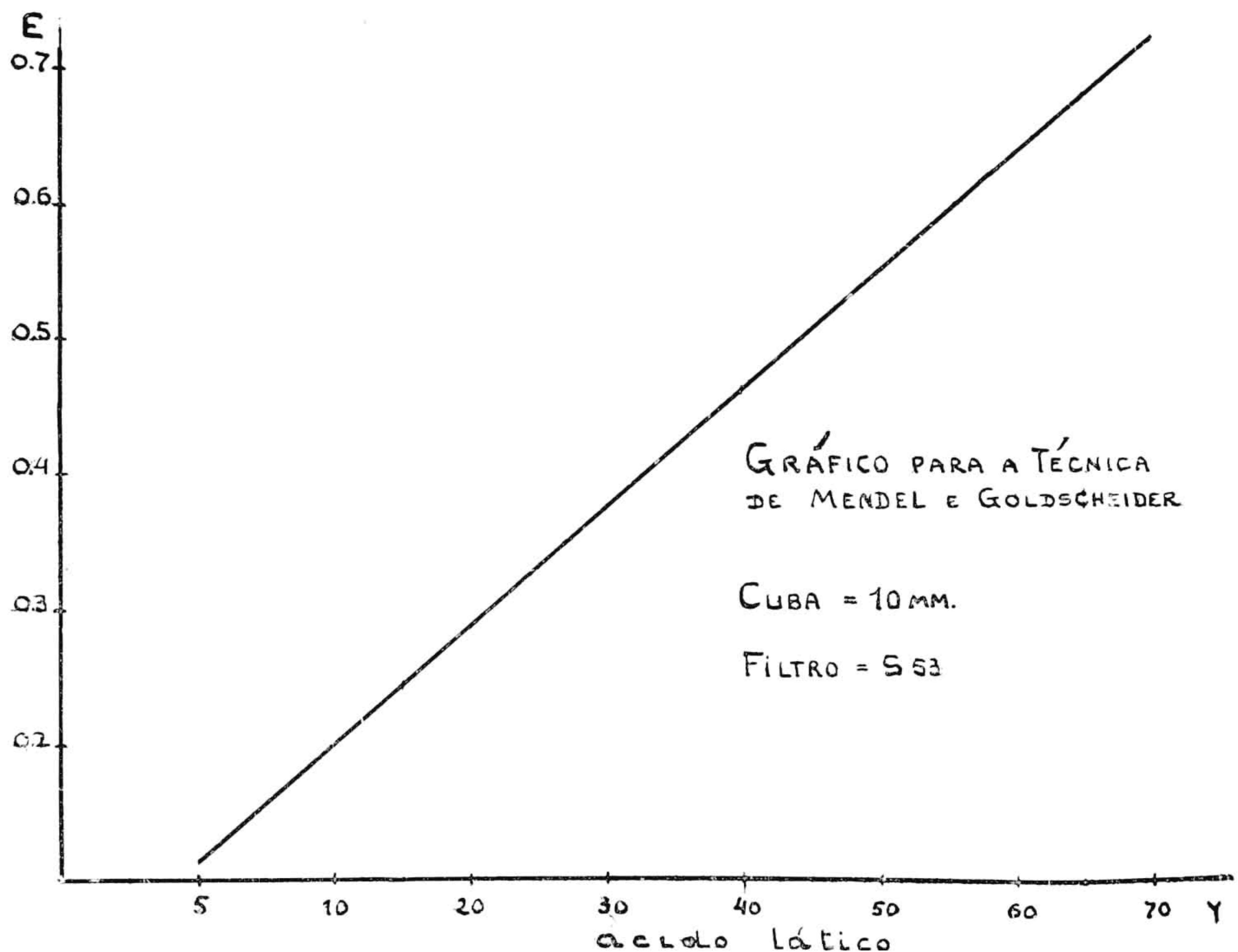
AUTOR	ANO	ANTI-CCAGULANTE	DESPROTEINIZANTE	REAGENTE	MGR % DE ÁCIDO LÁTICO	LEITURA	TÉCNICA
Flechter e Hopkins (14) . . . . .	1910	Nenhum	Sulfato ácido de cobre	Tiofeno	—	Colorímetro	Original
Chelle, L. (6) . . . . .	1914	»	—	Codeína	—	Colorímetro	Original
Harrop, G. (27) . . . . .	1920	»	Salkowsky	Guaiacol	—	Colorímetro Duboscq	Original
Mendel e Goldscheider (37) . . . . .	1926	»	Acido metafosfórico e Salkowsky	Veratrol	—	Colorímetro Authenricht	Original
Dische, Z. - Laszlo, D. (10) . . . . .	1927	»	Metafosfato de sódio, acido sulfúrico e Salkowsky	Hidroquinona	11,35	Colorímetro Duboscq e Walpole	Original
Fuchs, H. J. (20) . . . . .	1930	»	Acido metafosfórico	Veratrol	—	Colorímetro	Mendel e Goldscheider
Nordbö, R. (40) . . . . .	1934	»	Acido metafosfórico em pó	Veratrol	19-27	Colorímetro Duboscq e Keilt	Mendel e Goldscheider
Ernst, E. Truka, J. (13) . . . . .	1934	Heparina	Somogyi	Cloreto férrico	11-20	Colorímetro	Takács
Milton, R. (39) . . . . .	1936	Fluoreto de amônio	Somogyi (zincosoda)	Veratrol	méd. 15,9 5,6-15,8	Foto-eletrômetro de Cambridge	Mendel e Goldscheider
Miller e Muntz (38) . . . . .	1938	Nenhum	Acido metafosfórico	p-hidroxidifenil	19,2	Fotômetro de Pulfrich	Mendel e Goldscheider
Koeneman, R. - (33) . . . . .	1940	»	Acido Metafosfórico	p-hidroxidifenil	—	Colorímetro foto-elétrico	Miller e Muntz (modificado)
Elgart, S. e Harris, J. S. (12) . . . . .	1940	Fluoreto de amônio	Acido tricloracético	Veratrol	—	Colorímetro Evelyn	Mendel e Goldscheider (modificado)
Mellü, (M. I.) (36) . . . . .	1941	Liquoid fluoreto de sódio	Somogyi II	Veratrol	6,9-14,5	Fotômetro Pulfrich	Mendel e Goldscheider (modificado)
Mello, (M. I.) (36) . . . . .	1941	Liquoid	Somogyi II	p-hidroxidifenil	6,9-15,4	Fotômetro Pulfrich	Miller e Muntz (modificado)
Gunther Schultze (N. F.) (25) . . . . .	1926	Fluoreto de amônio	Acido tricloracético	Veratrol	9-13	Colorímetro	Mendel e Goldscheider

Em um tubo com rólha (figura 2) que se mantém num vaso contendo gêlo, pipetam-se cuidadosamente 0,5 ml do filtrado e 3 ml de ácido sulfúrico gelado que se deixa cair lentamente no tubo. Lubrifica-se a rólha com a última gota do ácido, fecha-se e leva-se ao banho-maria fervente por cinco minutos. Retira-se do banho e mergulha-se novamente o tubo no vaso contendo gêlo. Quando estiver gelado o tubo, desarrolha-se e adiciona-se 0,1 ml de solução de veratrol. Agita-se o tubo conservando-o no gêlo e espera-se uma hora. No fim dêste tempo faz-se a leitura no fotômetro de Pulfrich. Filtro S. 53 cuba de 10 mm.

O resultado é lido diretamente no gráfico e o valor encontrado é multiplicado pelo volume de sangue usado para obtenção do ácido láctico em mg por 100 ml de sangue.

#### Construção do gráfico

Toma-se uma série de tubos em que se coloca 0,5 ml de uma solução contendo de 5 a 40 microgramas de ácido láctico. Opera-se do mesmo modo que para o filtrado de sangue. Com as extinções lidas traça-se o gráfico figurando as quantidades de ácido láctico na abcissa e as extinções em ordenada. O desenvolvimento da côr segue a lei de LAMBERT BEER, dentro destas quantidades. (Gráfico I).



## OBSERVAÇÕES

*Limpeza do material*

O tubo para o aquecimento do filtrado de sangue com ácido sulfúrico e a bureta para o ácido sulfúrico, devem ser lavados com ácido sulfúrico quente e depois com água destilada. Seca-se na estufa.

*Desproteíntização*

Como se pode verificar no quadro IV, vários desproteíntizantes têm sido empregados pelos diversos autores. Porisso, procuramos determinar a influência da desproteíntização no rendimento do ácido láctico nos filtrados. Empregamos o ácido tricloracético e as técnicas de desproteíntização segundo FOLIN e SOMOGYI (I e II).

Os resultados obtidos foram tabelados no quadro V.

QUADRO V  
DESPROTEÍNTIZANTES

Nº.	MG DE ACIDO LACTICO EM 100 ML DE SANGUE			
	ACIDO TRICLORACÉTICO	FOLIN-WU	SOMOGYI I	SOMOGYI II
1	9,23	9,50	9,60	9,72
2	11,58	11,60	11,60	11,75
3	12,10	12,25	12,40	12,50

A diluição do sangue influi na precipitação completa das proteínas e o rendimento do ácido láctico é uma função do pH do filtrado. A técnica de desproteíntização que deu resultados melhores de recuperação do ácido láctico adicionado ao sangue, foi a de SOMOGYI II.

*Adição do ácido sulfúrico*

O aldeído acético forma-se à temperatura ambiente quando se adiciona o ácido sulfúrico concentrado sobre uma solução contendo ácido láctico. Para evitar perda do aldeído acético, deve-se trabalhar com o ácido sulfúrico gelado e ter o cuidado de pipetá-lo com o tubo de reação mergulhado em cuba com gelo.

A produção do aldeído é uma função da concentração e quantidade do ácido sulfúrico usado. Quando se trabalha com amostras de teor elevado em ácido láctico, deve-se diluí-las com água destilada e tomar 0,5 ml da diluição. Pode-se também dobrar a quantidade do ácido sulfúrico.

### *Tempo de aquecimento*

MENDEL e GOLDSCHIEDER preconizam como tempo ótimo de aquecimento, quatro minutos. MILTON, ELGART e HARRIS, encontraram como tempo ótimo, cinco a 10 minutos. Fizemos uma série de determinações com uma mesma quantidade de ácido láctico empregando tempos diferentes. O máximo de rendimento foi entre quatro e cinco minutos. Aquecendo mais de 10 minutos, os valores diminuem.

### *Especificidade e sensibilidade*

Os corpos cetônicos, em geral, não perturbam a reação, o que permite o seu emprêgo nos casos de diabete e acidose.

O aldeído acético, o aldeído fórmico e o ácido pirúvico, dão coloração vermelha. Porém, como existem em quantidades mínimas no sangue, não alteram os valores.

A glicose dá desenvolvimento de côr com o veratrol. Tratando-se o filtrado pelo método de SALKOWSKY, elimina-se esta causa de êrro.

MENDEL e GOLDSCHIEDER encontraram uma sensibilidade para o método de 1/200.000, trabalhando com o colorímetro AUTHENRIETH. MILTON, de 5 a 30 microgramas, usando fotoelectrômetro de Cambridge. ELGART e HARRIS, com o colorímetro fotoelétrico de Evelyn e usando filtro S 520 verificaram uma sensibilidade ótima entre 10 e 90 microgramas.

### *Técnica de Miller e Muntz*

EEGRIWE verificou que o aldeído acético produzido pela oxidação do ácido láctico em presença do ácido sulfúrico concentrado, produz com o p-hidroxidifenil uma coloração violeta intensa. MILLER e MUNTZ estudando os fatores que influenciam a oxidação do ácido láctico e subsequente reação colorimétrica com o p-hidroxidifenil, converteram o test qualitativo de EEGRIWE em método para dosagem de ultra-micro-quantidades de ácido láctico dada a alta sensibilidade do reativo para o aldeído acético.

### *Princípio do método*

As proteínas do sangue são removidas pela técnica de SOMOGYI e o filtrado aquecido com ácido sulfúrico, copulado com o p-hidroxidifenil e a côr desenvolvida lida no fotômetro de Pulfrich, filtro S 57 e cuba de 5 mm.

### *Reagentes*

(Os desproteinizantes são os mesmo empregados na técnica anterior).



- 1 — ácido sulfúrico  $D = 1,84$  (Kahlbaum pro-análise);
- 2 — solução de p-hidroxidifenil (dissolvem-se 225 mg dos cristais de p-hidroxidifenil em 10 ml de solução de soda 0.18 M. É uma solução quase saturada. Os cristais formados são redissolvidos aquecendo-se a solução antes de usá-la. Esta solução é estável até três meses (KOENEMANN).

#### Purificação do P-Hidroxidifenil

Dissolvem-se cerca de 30 grs em um volume mínimo de acetona pura e quente  $55^{\circ}\text{C}$ . Adiciona-se água até a formação de sólidos e esfria-se a  $0^{\circ}\text{C}$ . Obtêm-se cristais por filtração em Buchner. Redissolvem-se-os em acetona quente e repete-se a cristalização mais duas vezes. Secam-se os cristais em corrente de ar e depois a  $80^{\circ}\text{C}$  por 12 horas.

- 3 — Solução de lactado de lítio;
- 4 — solução de tungstato de sódio a 10 %;
- 5 — solução de sulfato de cobre a 7 %.

#### Técnica

Pode-se trabalhar com 1 ml, 0,5 ou 0,1 ml de sangue. A desproteïnização é feita como na técnica anterior, observando-se apenas a proporção dos reativos, de acordo com as quantidades de sangue empregadas.

Tomam-se 0,2 ml de filtrado obtido em um tubo com rólha, (fig. 2) que se mergulha em água gelada. Adicionam-se vagarosamente, 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado exatamente medidos. A rólha deve ser lubrificada com a última gota. Fecha-se então o tudo e agita-se cuidadosamente para misturar bem o conteúdo. Coloca-se no banho-maria fervente por cinco minutos exatos. Esfria-se imediatamente em água gelada por 10 ou 15 segundos. Retira-se o tubo e roda-se por alguns segundos num ângulo de  $\pm 25^{\circ}$  para a horizontal. Deixa-se na vertical e adiciona-se com a micro-pipeta de KROGH ou outra pipeta milesimal 0,02 ml da solução de p-hidroxidifenil. Tem-se o cuidado de pipetar bem no centro do tubo para que as partículas não adiram às paredes. Agita-se o tubo para dissolução e mistura total do reagente, deixando-se depois em repouso por uma hora à temperatura de 25 a  $30^{\circ}\text{C}$ .

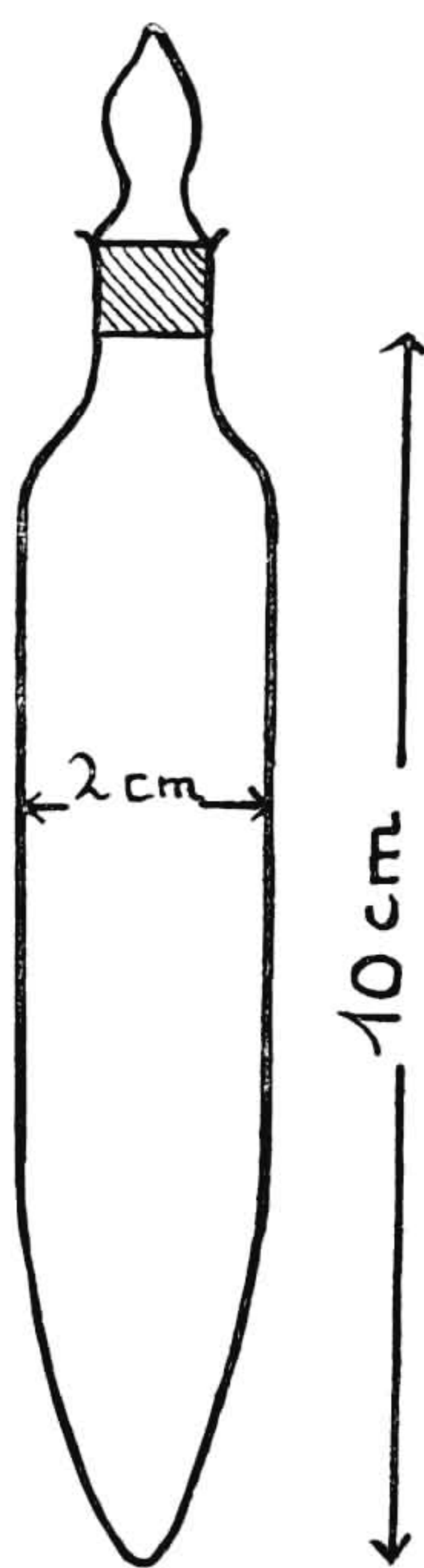


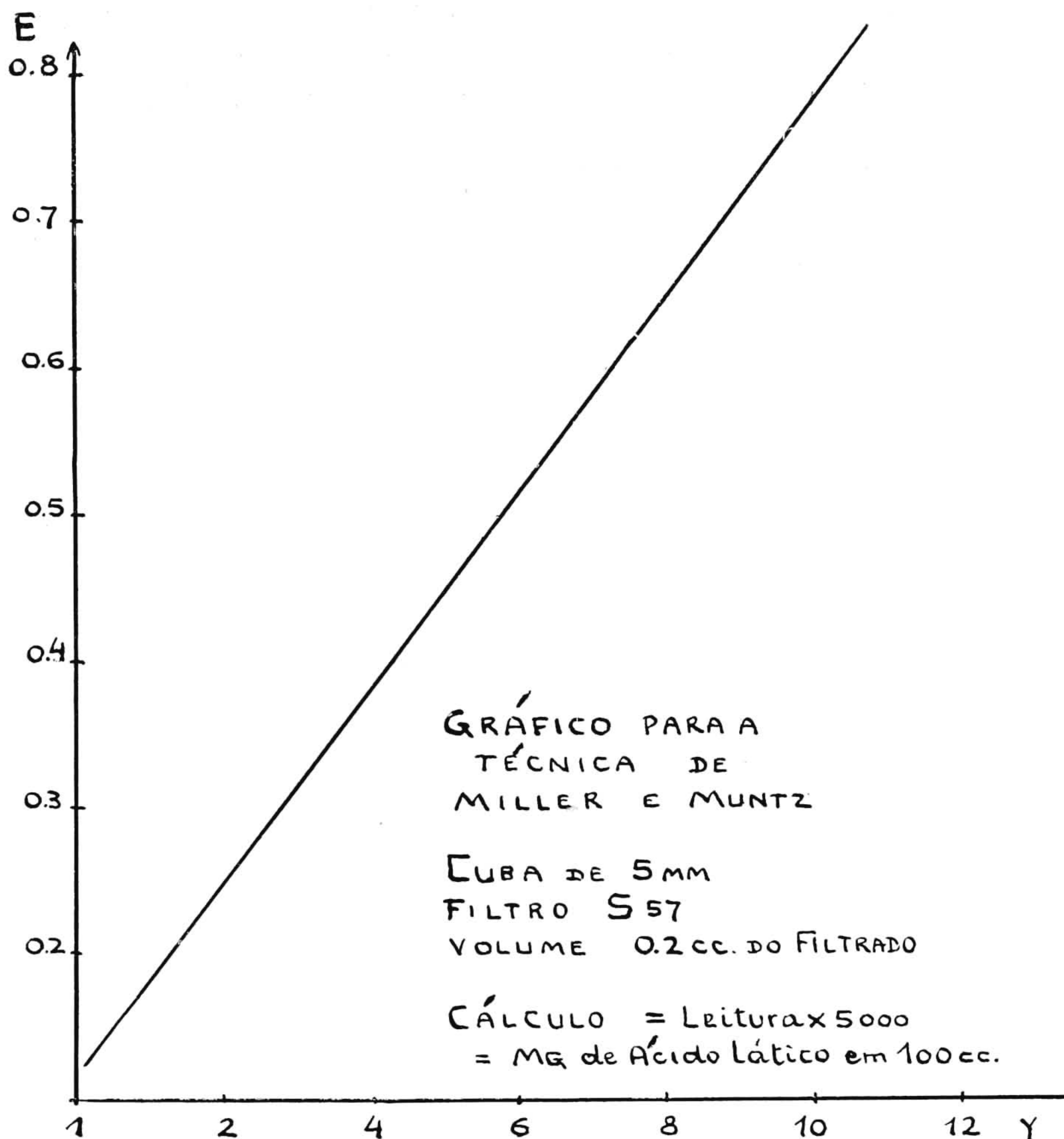
FIG. 2

No fim d'êste tempo o máximo de côr é desenvolvido. Aquece-se em banho-maria fervente por 30 ou 40 segundos para dissolução completa do reagente. Esfria-se e faz-se então a leitura no fotômetro gradual de PULFRICH, usando-se a cuba de 5 mm e o filtro S 57.

Os resultados são lidos na curva de calibração.

#### Construção do gráfico

Toma-se uma série de tubos contendo de 0,5 a 10 microgramas de ácido láctico em 0,2 ml da solução de lactado de lítio (Gráfico II).



### *Especificidade*

O p-hidroxidifenil foi empregado com vários ácidos orgânicos que estruturalmente estão relacionados ao ácido láctico e que podem estar a êle associados em reações biológicas. Apenas o ácido pirúvico dá uma pequena coloração. Empregamos porisso o sangue liquoidado adicionado de fluoreto de sódio que impede a transformação do ácido láctico em ácido pirúvico. Outra vantagem do p-hidroxidifenil é não dar reação com os hidratos de carbono em geral. Isto permite dosar o ácido láctico em sangue de diabéticos sem prévio tratamento do filtrado pelo sulfato de cobre e hidróxido de cálcio.

E' um método extremamente simples, específico e ultra-sensível para o ácido láctico. Enquanto nas outras técnicas podia-se trabalhar com amostras contendo no mínimo 10 a 100 microgramas de ácido láctico, esta tem uma sensibilidade ótima entre 5 a 10 microgramas e pode ser empregada para dosar quantidades tão pequenas como 0,1 micrograma de ácido láctico.

### *Erro dos métodos estudados*

Determinamos o teor em ácido láctico de 20 indivíduos normais pelos métodos de EDWARDS, MENDEL e GOLDSCHIEDER, e MILLER e MUNTZ, por nós modificados em alguns pontos. Os resultados obtidos forneceram as seguintes médias e desvios de média.

QUADRO VI

MAX. E MIN.	ACIDO LATICO EM Mg PARA 100 MI DE SANGUE		
	EDWARDS	MENDEL E GOLDSCHIEDER	MILLER E MUNTZ
Máx.....	15,25	14,45	15,40
Mín.....	7,30	6,94	6,90
Méd.....	10,30	10,78	10,59
D. M.....	2,96	3,68	4,46

### *Resumo e conclusões*

Apresentamos uma resenha dos principais métodos empregados para determinação do ácido láctico no sangue. Entre eles descrevemos os de EDWARDS (titulométrico), MENDEL e GOLDSCHIEDER (fotométrico) e MILLER e MUNTZ (fotoelétrico), com as modificações por nós introduzidas e resumiremos a seguir.

- 1) Na técnica descrita por EDWARDS, fizemos as seguintes alterações:
  - a) adição de uma placa porosa no tubo de absorção;
  - b) passagem de corrente de ar no frasco de reação, afim de expulsar os corpos cetônicos voláteis, antes de conectar o tubo D e abrir o reservatório de permanganato. Evita-se assim a oxidação e combinação ao bisulfito de outras substâncias que não o aldeído acético;
  - c) conservação de tubo de absorção entre 18 a 20°C durante a destilação;
  - d) titulação do bisulfito combinado a 4° C.

Quando se trabalha com quantidades de ácido láctico acima de 5 mg, devem-se empregar quantidades duplas de bisulfito de sódio. Verifica-se a presença de quantidade elevada de ácido láctico pelo consumo do permanganato (nas dosagens normais consome-se uma média de 20 ml) e demora na mudança de cor no frasco de reação.

O método mostrou-se sensível em nossas mãos com amostras de 0,04 mg a 5 mg de ácido láctico (as concentrações são referidas ao ácido láctico equivalente do lactato de lítio).

O erro do método foi de 0,018 %. O valor médio para o ácido láctico determinado em 20 indivíduos normais de 18 a 40 anos, foi de 10,30 mg por ml de sangue total (quadro VI).

No método de MENDEL e GOLDSCHIEDER, modificamos:

- a) a técnica de desproteinização usando a de SMOOGYI (I) (sulfato de zinco e soda) em vez do ácido metafosforico;
- b) o aquecimento foi feito em tubos providos de rólha esmerilhada para impedir volatilização do aldeído acético no aquecimento;
- c) o ácido sulfúrico foi sempre gelado antes de usar e pipetado com o tubo de reação imerso no gelo a fim de evitar perda do aldeído acético que se forma à temperatura ambiente.

A técnica de desproteinização influi no rendimento do ácido láctico que está condicionado à diluição e pH dos filtrados.

Experimentámos várias técnicas de defecação (quadro V). A que forneceu melhor recuperação do ácido láctico adicionado ao sangue, foi a de SOMOGYI (II) (sulfato de cobre, tungstato de sódio).

Adaptámos o método colorimétrico ao espectrofotômetro de PULFRICH. O filtro de escolha é o S 53 e cuba de 10 mm.

A sensibilidade ótima foi entre 5 a 70 microgramas. O erro do método é de 0,23 % a média encontrada para o sangue humano normal, foi de 10,78 por 100 ml de sangue.

No método de MILLER, e MUNTZ, introduzimos:

- a) desproteinização pelo tungstato de sódio e sulfato de cobre;
- b) p-hidroxidifenil em solução saturada, como preconiza KOENEMANN;
- c) a solução de p-hidroxidifenil é estável até cinco meses quando guardada em vidro escuro e na geladeira.

A sensibilidade do método é de 0,1 a 10 microgramas, quando se usa o fotômetro gradual da PULFRICH, filtro S 57 e cuba de 5 mm.

Adaptámos o método para 0,1 ml de sangue.

O valor médio obtido para o sangue humano normal foi de 10,58 mg para 100 ml de sangue.

O erro do método em nossas mãos foi de 0,17 %.

### SUMMARY AND CONCLUSIONS

A critical study of three methods for the determination of lactic acid (EDWARDS, MENDEL & GOLDSCHIEDER, MILLER & MUNTZ) is presented and some modifications are proposed.

It was shown that more accurate results could be obtained with Edward's technic when an Iena glass filter is connected with the absorption tube. Before the dropping of the permanganate solution it is necessary to pass a current of air through the reaction flask to avoid the oxidation of the non-lactic acid substances which interfere with the reaction. The absorption tube must be maintained at 18°C during the distillation and the titration of the bisulphite binding aldehyde at 4°C. When the sample contains more than 5 mg it is useful to work with greater quantities of the bisulphite. More permanganate is consumed when the lactic acid concentration is higher. The sensitivity of the method permits the titration of 0.04 mg to 5 mg of lactic acid in the sample. The calculated error of the method gave 0.018 % and the normal values for blood determined in 20 human cases averaged 10.30 mg per 100 ml (Table VI).

MENDEL and GOLDSCHIEDER'S method was modified in the following details: Somogyi's deproteinization was performed instead metaphosphoric acid as in the original method; to avoid the evaporation of the acetic aldehyde during the heating time with sulfuric acid a special glass stopped tube is proposed (Fig. 2). The reaction with sulfuric acid and veratrol is performed in an ice bath. Blood proteins precipitants were tried and Somogyi's latest technic showed better results (Table V). Colorimetric readings were done in the PULFRICH photometer using filter S 53 and a 10 mm cup. The method is

accurate within an error of 0.23 % and samples of 5 to 70 microg. could be easily determined. Normal values for human blood averaged 10.78 mg per 100 ml. More accurate results were obtained with the technic of MILLER & MUNTZ. Slight modifications were introduced : deproteinization with copper sulfate and sodium tungstate; saturated p-hydroxydiphenyl solution according to KOENEMANN which is stable for 5 months when stored in the ice-box. Using the PULFRICH step-photometer the error is 0.17 % with samples varying from 0.1 to 10 microg. of lactic acid. The filter employed was S 57 with the 5 mm cup. The method was adapted to 0.1 ml of blood. Normal values for human blood gave an average of 10.58 mg per 100 ml.

## B I B L I O G R A F I A

- 1 — AVERY (B. P.) HASTINGS (A. B.)  
1931-32. A Gazometric method for the determination of lactic acid in the blood —  
Jour. Biol. Chem. 94, 273-280.
- 2 — BAISETT (A). BUGNARD (L). ROGEON (J).  
1938. Recherches sur la teneur du sang en acide lactique. Bull. Soc. Chim. Biol.  
20, 51.
- 3 — BAUMBERGER (J.) FIELDS (J.)  
1927-28. Manometric method for quantitative determination of lactic acid. —  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 25, 87-89.
- 4 — BOAS (I).  
1893. Eine neue Method der qualitativen und quantitativen Milchsäurebestimmung  
in mageninhalt — Deut. Mediz. Wochenschr. 39, 940-43.
- 5 — BOKELMANN (O).  
1927. Der Milchsäure gehalt des Blutes in der Sckwangerschaft und während der  
Geburt. Arch. fur Gynäkol 129, 726-35.
- 6 — CHELLE (L). MAURIAC (P).  
1914. Sur la transformation du glucose en acide lactique dans l'autoglycolyse du  
sang. Compt. Rev. Soc. Biol. 76.
- 7 — CLAUSEN (W).  
1922. A method for the determination of small amounts of lactic acid. J. Biol.  
Chem. 52, 263-280.
- 8 — COOK (L). HURST (R. H.)  
1933. Blood lactic acid in rest. Jour. Physiol. 79; 443.

- 9 — DENIGÈS (G).  
1910. Reactions analytiques de quelques fonctions organiques fondées sur leur transformation en dérivés aldehydiques et cétoniques. *Ann. Chim. Phys.* 18 (XVIII) 149.
- 10 — DISCHE (Z). LASZLO (D).  
1927. Über eine neue kolorimetrische Bestimmungsmethode der Milchsäure im Blute. *Bioch. Zeitschr.* 187, 344-362.
- 11 — EDWARDS (H. T.)  
1938. A simplified estimation of lactate in normal human blood. *Jour. Biol. Chem.* 125, 571-583.
- 12 — ELGART (S). HARRIS (J. S.)  
1940. Determination of lactic acid in blood. *Ind. Engen. Chem.* 12, 758-762.
- 13 — ERNST (E.) TRUKA (J.)  
1934. Milchsäurebestimmung in Blut. *Bioch. Zeitschr.* 272, 51-55.
- 14 — FLETCHER (W. M.) HOPKINS (F. G.)  
1907. Lactic acid in amphibian muscle. *Jour. Physiol.* 35, 247.
- 15 — FRIEDMAN (T. E.) COTONIO (M.) SHAFFER (P. A.)  
1927. The determination of lactic acid. *Jour. Biol. Chem.* 73, 335-358.
- 16 — FRIEDMAN (TH. E.)  
1928. On the determination of lactic acid in sugar solutions decomposed by alkali. *Jour. Biol. Chem.* 76, 751.
- 17 — FRIEDMAN (TH. E.) KENDALL (A. J.)  
1929. The determination of lactic acid. *Jour. Biol. Chem.* 82, 231.
- 18 — FRIEDMAN (TH. E.) GRAESER (J.)  
1933. The determination of lactic acid. *Jour. Biol. Chem.* 100, 291.
- 19 — FRIES (H.)  
1911. Über das Vorkommen von Milchsäure im menschlichen. Blute — *Bioch. Zeitschr.* 35, 368-385.
- 20 — FUCHS (H. J.)  
1930. Einige Verbesserungen der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung — nach Mendel-Goldscheider-Biochem. *Zeitschr.* 217, 405-408.
- 21 — FÜRTH (O.)  
1910. *Cit. do Bioch. Zeitschr.* 26, 202.

- 22 — FÜRTH (O.) CHARNASS (D.)  
1910. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. *Bioch. Zeitschr.* 26, 199-220.
- 23 — GALVÃO (P. E.) FLORENCE (C. H.) PEREIRA (J.)  
1938. Modificação do método permangânico-iôdo-métrico para a dosagem do ácido láctico. *Arch. Inst. Biol.* 9, 39-50.
- 24 — GORDON (J. J.) QUASTEL (J. H.)  
1939. Determination of lactic acid. *Bioch. Jour.* 33, 8, 1934.
- 25 — GÜNTHER SCHULTZE (K. F.)  
1926. Milchsäure gehalt des Schwangerenblutes-Zentralbl. *Gynäkol* 50, (2) 1759.
- 26 — HALLOCK (P.)  
1938. Lactic acid after exercise with particular reference to polycythemia Rubra Vera — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38, 4, 587.
- 27 — HARROP JR. (G. A.)  
1920. A method for the estimation of lactic acid in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 17, 7, 162-63.
- 28 — HÜBNER  
1903. Citado do *Bioch. Zeitschr.* 68, 175, 1910.
- 29 — JERUSALÉM (E.)  
1908. Über ein neue Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in Organen und tierischen Flüssigkeiten. *Bioch. Zeitschr* 12, 361-379.
- 30 — JERWELL (O.)  
1928. Investigation of the concentration of lactic acid in blood and urine. *Acta Med. Scandinav. Suppl.* XXIV, 135 págs.
- 31 — KERLY (M.)  
1933. Citação de Wendel (44).
- 32 — KILLIAN (J.)  
1926. Lactic acid of normal acid pathological spinal fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 23, 255.
- 33 — KOENEMANN (R. H.)  
1940. A modification of the Miller-Muntz method for colorimetric determination of lactic acid. *Jour. Biol. Chem.* 135, 1, 105-109.



- 34 — MEISSNER (R.)  
1935. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure in Organextrakten als Kohlenoxyd. *Bioch. Zeitschr.* 68, 175-190.
- 35 — MEJIA (J. E.)  
1939. Glicémia y lacticémia. *Crônica Médica* 56, 908, 33-61.
- 36 — MELLO (M. I.)  
1941. Determinação do ácido láctico no sangue. *Rev. Bras. Biol.* 1 (1) 63-68.
- 37 — MENDEL (B.) GOLDSCHIEDER (I.)  
1925. Eine kolorimetrische Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure im Blut. *Bioch. Zeitschr* 164, 163-174.
- 38 — MILLER (B.) MUNTZ (J.)  
1938. A method for the estimation of ultramicro-quantities of lactic acid. *Jour. Biol. Chem.* 126, 413-421.
- 39 — MILTON (R.)  
1936. Notes on Mendel and Goldscheider's method for determining lactic acid in blood. *Analyst* 61, 91-96.
- 40 — NORDBÖ (R.)  
1934. Zur methode der Milchsäurebestimmung nach Mendel und Goldscheider. *Bioch. Zeitschr.* 271, 213-215.
- 41 — RIPPER (M.)  
1900. Eine allgemeine anwendbare, massanalytische Bestimmung der Aldehyd.-  
*Monatschr. Chem.* 21, 1.070-1.083. Cit. de *J. Biol. Chem.* 1922, 52, 263-280.
- 42 — RONZONI (E.) WALLEN-LAWRENCE (Z.)  
1927. Determination of lactic acid in blood — *Jour. Biol. Chem.* 74, 363-377.
- 43 — TANAKA (SH.) ENDO (M.)  
1929. Methode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in den Tierischen Flüssigkeiten und Geweben. *Bioch. Zeitschr.* 210, 120.
- 44 — WENDEL (W. B.)  
1933. A note of the determination of lactic and pyruvic acids *Jour. Biol. Chem.* 102, 47.
- 45 — WINNICK (T.)  
1942. Microdiffusion methods based on the bisulfite reaction. II. Determination of lactic acid by oxidation with ceric sulfate. *Jour. Biol. Chem.* 142, (2) 451-459.
- 46 — WOLF (C. A. L.)  
1914. The determination of lactic acid. *Jour. of Physiol.* 48, 341-358.