

Considerações sôbre a técnica de determinação do "Índice Lipásico Seabra"

por

M. I. Mello & Laura T. Queiroga

(Instituto Oswaldo Cruz & Conjunto Sanatorial de Curicica)
Rio de Janeiro, D.F. — Brasil

A existência de um poder lipolítico no sôro, foi assinalada por HANRIOT em 1896 (14). A esta diastase de pressuposta origem pancreática, denominou *Lipase* (15). No ano seguinte, porém, demonstrou que a lipase que se encontra normalmente no sangue, não provém do pâncreas, uma vez que a retirada dêste órgão não altera o teor da lipasemia. Verificou outrossim, que a atividade lipásica sôbre a monobutirina varia com a "alcalinidade do meio" e que a *lipase* pancreática é diferente da do sôro (16).

O termo *lipase*, foi criticado por ARTHUS, que empregando vários substratos, demonstrou que o enzima presente no sôro não tem poder lipolítico sôbre os óleos animais e vegetais formados de tripalmitina e triestearina, mas decompõe a monobutirina (3). Confirma assim a atividade do enzima do sôro sôbre monobutirina assinalada por HANRIOT e propõe que se denomine de *monobutirinase*, a diastase do sôro que desdobra a monobutirina (3) (6) (17).

A êste enzima presente no sôro e que desdobra a monobutirina e a tributirina e age sôbre ésteres simples (butirato de etila) OPPENHEIMER em 1925 classificou de esterases (25), ADAMS & WHITTAKER classificaram as esterases presentes no sôro de acôrdo com o substrato sôbre o qual agem, em 3 classes principais:

1) *Aliesterases ou esterases alifáticas*, as que hidrolisam a tributirina, butirato de metila, etc., e ésteres alifáticos.

2) *Colinesterases verdadeiras ou específicas*, as que hidrolisam a acetilcolina.

3) *Colinesterases não específicas*, as que hidrolisam tanto os ésteres de colina como os ésteres alifáticos (1).

As *lipases* catalisam a hidrólise de gorduras neutras, fosfolípidos e ésteres de colesterol. Agem sôbre gorduras verdadeiras, óleos ou triglicérides de ácidos graxos contendo mais de 21 átomos de carbono.

Inúmeros autores (DOYON & MOREL 1902 (8), CARRIÈRE, 1905, LÖVENHART, 1907 (21), RONA & MICHAELIS, 1911 (28), KOLLERT & FRISCH, 1921 (9), WILLSTÄTTER & MEMMEN, 1924 (33), CHERRY & GRANDALL, 1932 (7), ROE & GOLDSTEIN, 1943 (27), ADAMS & WHITTAKER (1), MEYER & MALGRAS, 1953 (24) e outros, confirmaram as experiências de HARRIOT e de ARTHUS, ficando *assim* as lipases e esterases bem definidas quer pela sua atividade enzimática bem diferenciada por meio de substratos, sua origem, usando ativadores e inibidores, que por seus caracteres físico-químicos (4), (12), (20), (34).

Apesar disto a denominação de *lipase*, continua a ser empregada indistintamente na literatura para designar o enzima presente no sôro humano normal. No sôro humano normal existem *esterases* que são responsáveis pela pequena hidrólise observada quando se usa óleo de olivas, *tweens* ou tributirina como substrato (13), (31), (2).

A lipase pode entretanto, aparecer no sangue sob condições patológicas. Os órgãos contém lipase. Quando um órgão é agredido (pulmão, bacilo de Koch; fígado, agentes tóxicos; distúrbios pancreáticos, etc.) a lipase é liberada para o sangue, podendo ser parcialmente determinada sua origem por meio de inibidores (quinino, atoxil, fluoreto de sódio) ou ativadores (sais e ácidos biliares, cloreto de cálcio e ácidos aminados, ex. leucilglicilglicina (DAWSON 1927) etc.). (24), (26), (1), (20), (25), (28), (5).

Assim a lipasemia oferece sob o ponto de vista clínico um grande interêsse para o diagnóstico e prognóstico de certas doenças, e vários métodos têm sido propostos para a sua determinação.

Tomando o substrato como referência para um rápido apanhado das técnicas mais empregadas, citaremos: a de RONA & MICHAELIS, que usa a tributirina, (28) de ARCHIBALD (2) e GOMORI (12) que empregam os *Tweens* (ésteres poliglicólicos do ácido esteárico); e por último as que utilizam o óleo de olivas, ex. WILLSTÄTTER LEITZ & MEMMEN, (1923) LÖVENHART (21), CHERRY & CRANDALL, (35), (7).

Várias críticas tem sido feitas aos dois primeiros substratos, pois que ambos são hidrolizados pelas esterases e lipases. Sendo o óleo de olivas o que menos sofre a ação das esterases é o substrato mais empregado pela maioria dos autores.

A determinação do "*Índice lipásico Seabra no diagnóstico da tuberculose*" despertou o nosso interêsse (23). Discrepâncias técnicas encontradas no correr das determinações, levou-nos a um estudo posterior do método, cujo resultado constitue o objeto do presente trabalho.

O "*Índice lipásico Seabra*" é determinado pela técnica de CHERRY & CRANDALL ligeiramente modificada. Em vez do óleo de olivas, SEABRA usa o óleo de caroço de algodão e como agente emulsificante a goma arábica (29).

Como o autor não esclarece sobre o pH e sais do tampão e pH do substrato, procuramos inicialmente verificar:

- a) pH de várias empolas da emulsão oleosa;
- b) pH do tampão recentemente diluído e conservado durante um mês na geladeira;

- c) pH do sistema; enzima — tampão — substrato;
- d) ponto de viragem da fenolftaleína, determinando electrometricamente o pH inicial e final, da reacção enzimática.

As determinações foram feitas em cada elemento observando-se as condições da técnica. Foi usada uma mistura de sôro humano normal e outra de soros de tuberculosos.

MATERIAL E MÉTODO

Empregamos o reagente Lipásico Seabra, que nos foi gentilmente fornecido pelo autor em épocas diferentes (4 caixas contendo 60 empolas da emulsão oleosa e 6 empolas do tampão (4 das caixas e 2 empolas sobressalentes).

REATIVOS

- 1) Emulsão oleosa em empolas de 5 ml.
- 2) *Soluto* tampão em empolas de 5 ml. Medir exactamente 5 ml e diluir em água distilada para 75 ml. Esta solução pode ser guardada para utilização ulterior.
- 3) Soda N/20 preparada no Laboratório e titulada no momento de usar, partindo de uma solução de soda N/1 livre de carbonato.
- 4) Álcool etílico neutro.
- 5) Fenolftaleína alcoólica 1‰.

VIDRARIA

Entre os frascos reativos sugeridos pelo autor, usamos rotineiramente balões de Erlenmeyer de capacidade de 60 ml., em vez de tubos ou vidros de penicilina.

TÉCNICA

Seguimos a técnica exactamente como aconselha Seabra.

Em um balão de Erlenmeyer toma-se exactamente 1 ml. de sôro límpido, 2 ml. da emulsão oleosa bem homogeneizada, 3 ml. de água distilada e 0.5 ml. do soluto tampão. Agita-se bem e coloca-se na estufa a 37°C por 24 horas.

Ao mesmo tempo prepara-se um testemunha do mesmo modo que acima, substituindo-se o sôro por água distilada.

Após um período de 24 horas de incubação junta-se a cada frasco reativo 3 ml. de álcool etílico neutro e 1 gota de fenolftaleína. Titula-se pela soda N/20.

CÁLCULO

ml. de soda gastos com o sôro — ml. de soda gastos com o testemunha multiplicado por 10 = "Índice Lipásico Seabra".

No presente trabalho, o intuito foi de relacionar a influência do pH sobre os resultados obtidos, o ponto de viragem e pH, uma vez que o autor julga indispensável para critério de viragem da fenolftaleína, que, a cor obtida seja igual à da amostra de pano, anexa à última técnica que acompanha a caixa.

RESULTADOS

a) pH do substrato:

As empolas foram homogeneizadas por agitação manual forte, e partidas no momento de usar.

Em um beaker foram pipetados cuidadosamente 2 ml da emulsão oleosa e 4,5 ml de água distilada para perfazer o volume total da

técnica. Misturou-se bem e a determinação do pH foi procedida imediatamente.

Os resultados das leituras constam da tabela I.

TABELA I
pH do reagente lipásico "Seabra"
(Emulsão oleosa)

EMPOLA N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH...	6,0	6,2	5,8	6,1	6,25	6,2	6,25	6,1	6,25	6,4

Os números assinalados correspondem ao pH das várias misturas de empolas procedentes dos laboratórios do Hospital do Galeão, do posto de Saúde n.º 1 da Prefeitura e do Conjunto Sanatorial de Curicica.

Substrato: Interpretação dos resultados.

A análise dos resultados obtidos para as várias empolas de substrato, (max. pH 6,4 — min. pH 5,8) demonstra claramente ser êle passível das mesmas críticas feitas à emulsão de CHERRY & CRANDALL, as quais enumeramos a seguir:

a) Usando goma arábica como agente emulsificante, e benzoato de sódio como estabilizador, a emulsão de CHERRY e CRANDALL recentemente preparada tem pH 7,0, mas à medida que envelhece, êste vai se tornando ácido. O substrato em pH 7,0 já é abaixo do limite mínimo para a atividade da lipase do sôro, que segundo vários autores está entre 7,5 e 9,2, sendo considerado ótimo 8,5 (Quadro IV).

b) A tendência de formar quando em repouso duas camadas, uma aquosa e outra oleosa, dificulta o contato enzima/substrato, não se podendo precisar até que ponto isto afeta a hidrólise. No caso, uma agitação permanente durante o tempo de incubação seria o meio de mantê-la homogênea. Para corrigir estas falhas, GOLDSTEIN & ROE (10), BALLS & Col (5), MACLAY (22), MEYER & MALGRAS (24), sugerem o emprego da bile de boi em glicerol, o ácido cólico ou desoxicólico ou o oleato de sódio como agentes emulsificantes.

c) A viscosidade da emulsão, que dificulta a medida exata e o escoamento total e rápido da pipeta.

d) A instabilidade da emulsão oleosa e hidrólise espontânea e ocasional do óleo, bem como a diferença do índice de saponificação para cada partida de óleo JOHNSON e BOCKUS 1940) (18).

b) *pH do tampão.*

Da empola contendo o tampão, apresentada em envoltório de cartolina verde, foram pipetados, usando pipeta volumétrica, exatamente

pécies de gramineae de beira de lagôa. Esta zonação foi muito prejudicada pelo pisoteio dos pescadores que vendiam tainhas e linguados em Julho a Agosto de 1955 nos arredores de nossa estação 18. Desde 140 metros até a pitangueira ha um terreno com areia solta que a remirea procura invadir.

Finalmente, expusemos as associações nos locais onde abriram barra: a Barra Nova, que se abria naturalmente foi a que deu muito peixe á lagôa, e é a que os velhos dizem ter saudades; aterrada esta, apareceram outras, cada qual com suas vantagens e inconveniencias, mas outros aterros trouxeram modificações que influiram nestas outras barras. As barras artificiais não permanecem abertas suficientemente, a lagôa vai sendo aterrada e vai perdendo muito de sua capacidade de renovamento por agua por mar.

BIBLIOGRAFIA

- DANSEREAU, P., 1947, Zonation et succession sur la restinga de Rio de Janeiro. I Halosère. *Rev. Can. Biologie*, VI (3) 448-447. Montreal.
- FARIA, & E. MAGALHÃES, 1939, A Lagoa de Saquarema. *Bol. Min. Agric. Serviço de Caça e Pesca*. — Julho-Setembro 1939. 23 p.
- LAMEGO, A. R., 1945, Ciclo evolutivo das lagunas fluminenses. *Bol. Div. Geol. Min. Ministerio da Agricultura*. 96, 1-73. Rio de Janeiro.
- MAGNANINI, A., 1954, Contribuição ao estudo das zonas de vegetação da Praia de Sernambetiba. *Arquiv. Serv. Florestal*, 8, 147-232.
- OLIVEIRA, L. de & L. KRAU, 1953, Levantamento biogeografico da Baia de Guanabara. II — Crescimento de manguesal na Ilha do Pinheiro. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 51, 503-524.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. J. GERALDO KUHLMANN, a determinação do material botânico, colhido em margens de lagôas, existente na Estação de Hidrobiologia do Instituto Oswaldo Cruz; e ao Dr. ALCEO MAGNANINI herbário de plantas da praia de Sernambetiba.

TABELA III

Determinação electrométrica do pH dos reativos antes de incubar o material.

N.º	Substrato ml	Água ml	Tampão ml	Álcool ml	pH 1x	Das 2x	Amostras 3x
1.....	—	6,5	—	—	6,9	6,7	6,9
2.....	—	6,0	0,5	—	6,9	6,82	6,8
3.....	2,0	4,5	—	—	6,1	6,25	6,4
4.....	2,0	4,0	0,5	—	6,7	6,75	6,8
5.....	—	6,5	—	3,0	6,5	6,78	7,32
Sôro 1 ml.....	2,0	3,0	0,5	—	7,4	7,35	7,25

O pH 7,4 foi o mais alto obtido usando os reagentes para a determinação do “Índice Lipásico Seabra”.

Êstes valores foram obtidos por três técnicos diferentes, usando os reativos dos laboratórios do Hospital do Galeão, Posto de Saúde n.º 1 da Prefeitura e do conjunto Sanatorial de Curicica.

Ponto de viragem e pH electrométrico

O autor recomenda que o julgamento da viragem da fenolftaleína seja *exatamente o mesmo, com o tubo de sôro e o “Testemunha”*. Como o testemunha é preparado com água destilada em vez de sôro, e o método é titulométrico, torna-se difícil a comparação da côr.

QUADRO IV

AUTOR	Tampão pH	SUBSTRATO	Ano
Lövenhart (21).....	7,0	Butirato de etila.....	1907
Rona e Michaelis (28).....	7,6	Tributirina.....	1911
Willstätter e Pollinger (35).....	8,9	Oleo de olivas.....	1923
Cherry e Crandall (7).....	7,0	Oleo de olivas.....	1932
Penau e Guilbert (26).....	8,4	Tributirina.....	1936
Balls, Matlack (4).....	8,0	Oleo de olivas.....	1937
Goldstein e Roe (27).....	8,9	Oleo de olivas.....	1943
Maclay (22).....	8,5	Oleo de olivas.....	1948
Goldstein, Epstein, Roe (11).....	9,6	Triburitina.....	1948
Gomori (12).....	8,3	Tweens.....	1949
Smith, Lubuf, Thornton (32).....	8,8	Tributirina.....	1949
Seligman e Machlas (31).....	7,4	α -naftillaurato.....	1950
Meyer e Malgras (24).....	8,5	Oleo de olivas.....	1953
Gomori (13).....	7,0	Oleo de olivas.....	1954

A fim de evidenciarmos se o ponto de viragem por nós observado correspondia ao ponto final da titulação, procuramos em uma série

de titulações, determinar electrometricamente o pH, ao atingir o ponto de viragem da fenolftaleína. Os resultados constam do Quadro V.

QUADRO V

Ponto de Viragem de fenolftaleína e pH lido

SORO N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	8	Test. água
pH..	9,65	9,6	9,65	9,72	9,72	9,8	9,8	9,8	9,7	9,55

a) A fenolftaleína, incolor em soluções ácidas, dá uma cor rósea em pH 8.3 indo até o avermelhado quanto mais alcalina for a solução. b) A faixa de mudança de cor da fenolftaleína é entre pH 8.3 e 10.65 (19). c) A comparação de cor, recomendada pelo autor entre o ponto de viragem do frasco testemunha e o contendo soro torna-se difícil devido à pigmentação do soro e à presença de proteínas.

CHERRY & CRANDALL bem como todos os autores que trabalharam o método empregam no tubo controle, soro inativado o que facilita a comparação. No caso Seabra o controle é feito com água destilada.

Como se pode observar no quadro V a leitura do ponto final de viragem foi sempre feito entre pH 9.5 e 9.8, o que demonstra que o erro pessoal é pequeno uma vez que se atinge a viragem do indicador com mais de uma unidade acima do seu ponto inicial (pH 8.3).

Alguns autores ajustam o pH antes de iniciar a reação (MACLAY inicial pH 8.5) (GOLDSTEIN et als inicial, pH 9.35) (11), (22). Os ml de NaOH 0.05N gastos para atingir o pH inicial após a incubação representam os de ácidos graxos liberados pela lipase.

Com os reagentes Seabra, o valor inicial foi pH 7.25-7.4, isto é, bem abaixo do limiar do indicador, e o final entre 9.55-9.8.

A determinação electrométrica do ponto inicial e final da reação, reduz a um mínimo os erros associados à titulação em meio heterogêneo.

CONCLUSÕES

Foi feito um estudo detalhado do "reagente lipásico Seabra".

1) O *Substrato*, emulsão oleosa de óleo de caroço de algodão emulsionada com goma arábica apresentou nas empolas examinadas, um pH sub-ótimo oscilando entre pH 5,8-6,4. As variações encontradas em empolas procedentes da mesma caixa e de caixas diferentes levam a pressupor: a) instabilidade da emulsão oleosa em goma arábica; b) hidró-

* Determinações realizadas pelos técnicos do Hospital do Galeão, Posto de Saúde n.º 1 da Prefeitura e do Conjunto Sanatorial de Curicica e Instituto Oswaldo Cruz em 30-31 de março de 1955.

lise espontânea do óleo; c) fontes diferentes de origem e preparação do óleo. Assim, as circunstâncias observadas em resultados obtidos para um mesmo sôro devem estar ligadas à variação dos pH das empolas.

2) O *tampão*, apresentou a mesma variabilidade de pH nas diferentes empolas estudadas, sendo também mais baixo que aquêlê estabelecido por CHERRY & CRANDALL. Enquanto na técnica original é aconselhado o pH 7,0, o “*soluto salino*” fornecido para a determinação do “Índice Lipásico” oscila entre pH 6,25-6,9 para as amostras estudadas. O pH do tampão está abaixo do mínimo registrado na literatura para a determinação da lipase no sôro. (Ver quadro V).

3) *Ponto de viragem do indicador.*

A comparação colorimétrica do tubo testemunha com o do sôro em estudo, torna-se difícil, mesmo procurando correlacioná-lo com a amostra de pano que acompanha a caixa do reagente. O tubo testemunha é completado com água enquanto aquêlê em que se determina o índice lipásico contém 1 ml de sôro. Se o ponto final de titulação em meio contendo proteínas, já apresenta por si só um problema na leitura da viragem, sua comparação com um contrôle de água destilada, acarretará maiores causas de êrro.

4) A técnica de CHERRY e CRANDALL modificada por SEABRA e aplicada ao sôro humano normal não evidencia lipase.

Deixamos aqui expressos os nossos agradecimentos aos Drs. ISMÉLIA ALVES VENÂNCIO e HUMBERTO TEIXEIRA CARDOSO pela determinação electrométrica do pH.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Ein ausfuehrliches Studium ueber das “Lipasische Seabra Reagent” wurde unternommen.

1) *Das Substrakt*, Baumwolloel mit Gummiarabikum emulsioniert, hat in den untersuchten Ampullen ein sub-optimales pH aufgewiesen, welches zwischen 5.8 und 6.4 schwankte. Die in den Ampullen einer selben oder verschiedener Packungen festgestellten Variationen lassen annehmen dass: a) eine Instabilitaet in der Oel-Gummiarabikum Emulsion herrscht; b) eine spontane Hydrolise des Oels stattfindet; c) das Oel verschiedener Herkunftten auf verschiedene Weisen zubereitet wird. Es ist also anzunehmen, dass die beobachteten Ungleichheiten in den Ergebnissen eines gleichen Serums der pH-Variation in den Ampullen zuzuschreiben ist.

2) *Das Buffer*, hat dieselbe pH-Variation in den studierten Ampullen aufgewiesen und zwar war auch dieses niedriger als das von CHERRY & CRANDALL aufgestellt worden ist. Waehrend in der Originaltechnik von S. & C. ein pH von 7.0 empfohlen wird, hat die salzige Loesung die uns zur Feststellung des lipasischen Titors gestellt wurde, eine pH-Variation aufgewiesen die zwischen 6.25 und 6.9 geschwankt hat. Das

pH des Buffers ist kleiner als das niedrigste welches in der Literatur fuer die Lipasedosierung des Serums angegeben wird.

3) *Wendungspunkt des Indikators* — Der kolorimetrische Vergleich der Testisroehre mit der des Serums ist erschwert, selbst wenn man versucht ihn mit dem Stoffmuster, das sich bei der Packng des Apparates befindet, zu vergleichen. Die Testisroehre wird mit Wasser aufgefuellt waehrend die andere, in welcher man den lipasischen Titer feststellt, 1 ml Serum enthaelt. Wenn schon der Endpunkt des Titration in einem Protein enthaltenden Medium Schwierigkeiten bei der Feststellung des Wendungspunktes aufweist, so verursacht dieser Vergleich, wenn er mit einer destillierten Wasser-Roehre angestellt wird, eine viel grossere Moeglichkeit von Fehlerquellen.

4) Die von CHERRY und CRANDALL aufgestellte Technik zeigt keine Lipase an, wenn sie fuer das normale menschliche Serum angewendet wird. Die leichte Hydrolise die stattfindet ist der Estearase zuzuschreiben.

ABSTRACT

A detailed study of Seabra's lipasic reagent for the diagnostic of tuberculosis has been made.

Substrate

The oily emulsion of cotton seed oil containing gum as dispersing agent, presented a pH variation to the ampoules examined. In these belonging to the same cartoon as well as in those from different cartoons the values obtained electrometrically ranged from pH 5.8-6.4 (Table I).

These variations lead us to presuppose:

- 1) instability of the oily emulsion in gum;
- 2) spontaneous hydrolysis of the oil;
- 3) different batches or technique of the oil extraction, or different sources.

Buffer:

The same variability observed with substrate was found for the buffer. In CHERRY & CRANDALL's method the buffer is pH 7.0. The *saline solution* from Seabra's oscillated from pH 6.25-6.9 (table II).

Titration — end point

A colorimetric comparison between the sample and the blank as suggested by Seabra becomes very difficult. The end point in the presence of serum, when phenolphthalein is used as indicator, is very difficult to compare with the blank containing water.

Conclusion.

The differences observed in the results when the same serum was used, must be due to the variations observd with Seabra's reagents.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, D.H. & WHITTAKER, V.P., 1949, The characterization of the esterases of human plasma. *Bioch. J.* 44(1) : 62-70.
2. ARCHIBALD, R.E., 1946, Determination of lipase activity. *J. Biol. Chem.* 165 : 443
3. ARTHUS, M., 1902, Sur la monobutyrase du sang. *J. Physiol. Pathol. Gén.* 4 : 56-68.
4. BALLS, A.K., MATLACK, M.B. & TUCKER, M.W., 1937, The hydrolysis of glycerides by crude pancreas lipase. *J. Biol. Chem.* 122(1) : 125-137.
5. BALLS, A.K. & MATLACK, M.B., 1938, Mode of action of pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.* 125(3) : 679-686.
6. BERNHARD, A., 1951, Serum lipases (tributyrase) in hypertension and arteriosclerosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78(2) : 533-55.
7. CHERRY, I.S. & CRANDALL, L.A., 1932, The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. *Am. J. Physiol.*, 100(2) : 266-273.
8. DOYON, M. & MOREL, A., 1902, La lipase, existe-t-elle dans le sérum normal? *C. R. Soc. Biol.*, 54 : 498-500 e 614-615.
9. FRISCH, A. & KOLLERT, V., 1921, Die sogenannten Blutlipasen bei Tuberkulose. *Beit. Klin. Tuberk.*, 47 : 146-159.
10. GOLDSTEIN, N.P. & ROE, J.H. 1943, Studies on pancreatic function. I. The determination of the lipolytic enzymes of blood serum. *J. Lab. Clin. Med.*, 28(11) : 1368-79.
11. GOLDSTEIN, N.P., EPSTEIN, J.H. & ROE, J.A., 1948, Studies on pancreatic function. IV. A simplified method for the determination of serum lipase using aqueous tributyrin as substrate with one hundred normal values by this method. *J. Lab. Clin. Med.*, 33(8) : 1047-51.
12. GOMORI, G., 1949, Determination of phenol in biological material. *J. Lab. Clin. Med.*, 34 : 275-81.
13. GOMORI, G., 1954, Methods for quantitative estimation of hydrolytic enzymes in serum and other biologic fluids. *A. J. Clin. Pathol.* 24(1) : 99-110.
14. HANRIOT, 1896, Sur un nouveau ferment du sang. *C. R. Acad. Sci.* 123 : 753-5.
15. HANRIOT, 1897, Sur la dosage de la lipase. *C. R. Soc. Acad. Sci.*, 124 : 235-7.
16. HANRIOT, 1897, Sur la non-identité des lipases d'origine différents. *C. R. Acad. Sci.* 124 : 778-81.
17. HOARE, R. & TUBA, J., 1951, Human serum tributyrinase III — Levels in cancer. *J. Lab. Clin. Med.*, 38(4) : 613-6.
18. JOHNSON, TH. A. & BOCKUS, H.L., 1940, Diagnostic significance of determination of serum lipase. *Arch. Intern. Med.*, 66(1) : 62-77.
19. KOLTHOFF, I.M., 1926, *Der Gebrauch von Farbenindikatoren*. 3.^a Ed. Berlin.
20. LÖVENHART, A. S. & PIERCE, G., 1906, The inhibiting effect of sodium fluoride on the action of lipase. *J. Biol. Chem.*, 2 : 397-413.
21. LÖVENHART, A.S., 1907, Are the animal enzymes concerned in the hydrolysis of various esters, identical? *J. Biol. Chem.*, 2 : 427-60.
22. MACLAY, E., 1948, A suitable substrate for the determination of pancreatic lipase in serum and other body fluids. *A. J. Med. Technol.*, 14(4) : 197-201.
23. MELLO, M.I., QUEIROGA, L.T. & MARCCHESI, P., 1955, "Índice Lipásico Seabra". Seu valor no diagnóstico da tuberculose. Em impressão.
24. MEYER, J. & MALGRAS, J., 1953, Contribution à l'étude des lipases dans le sérum tuberculeux. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 137(19/20) : 292-4.

25. OPPENHEIMER, C., 1925, *Die Ferments und ihre Wirkungen*. 5.^a Ed. Thieme/Verlag/Leipzig. pags. 229-47, e 466-97.
26. PENAU, GUILBERT, 1936, Determination de l'activité en lipase et esterase du sérum sanguin. *J. Pharm. Chim.*, 23(2) : 57-77.
27. ROE, J.H. & GOLDSTEIN, N.P., 1943, Studies of pancreatic function. II. The effect of injury to the pancreas or the liver upon the amylase and lipidase content of the blood. *J. Lab. Clin. Med.* 28(11) : 1334-44.
28. RONA, P. & MICHAELIS, L., 1911, Über Ester und Fettspaltung im Blut und im Serum., *Bioch. Zeit.*, 31 : 345-54.
29. SEABRA, P., 1954, Lipase e Tuberculose. *A Folha Médica*, 35(21) : 173-7.
30. SCOZ, G., 1940/41, Cit. em *The Enzymes*. Vol. 1, p. 1, pag. 400, SUMMER J.B. e MYRBÄCK K., Academic Press 1952.
31. SELIGMAN, A.M. & NACHLAS, M.M., 1950, The colorimetric determination of lipase and esterase in human serum. *J. Clin. Invest.*, 29(1) : 31-6.
32. SMITH, L.B., LUBERT, D.J. & THORNTON, H.R., 1949, Estimation of Lipase in dairy products. *Canad. J. Res.* 27(12), sec. F. 483.
33. WILLSTÄTTER, R. & MEMMEN, F., 1924, Vergleich von Leberesterase mit Pankreaslipase, über die stereochemische Spezifität der Lipasen. *Zeit. Physiol. Chem.*, 138 : 216-316.
34. WILLSTÄTTER, R. & MEMMEN, F., 1924, Über die Wirkung der Pankreaslipase auf verschiedene Substrate. VI. *Zeit. Physiol. Chem.*, 133 : 229-46.
35. WILLSTÄTTER, R., WALDSCHMIDT-LEITZ, R. & MEMMEN, F., 1923, Bestimmung der Pankreatischen Fettspaltung. I. *Zeit. Physiol. Chem.*, 125 : 93-131.