

HEMOGLOBINA DOS OFÍDIOS — VALORES NORMAIS E PRESENÇA DE UMA FORMA INATIVA NO SANGUE DA
BOTHROPS JARARACA (*)

POR

J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

No decurso de experiências sobre a regulação da glicemia dos ofídios, surgiu a necessidade de saber si o sangue obtido por secção de pequeno segmento da cauda, dada a possível diluição pelo líquido intersticial, teria a sua composição modificada. A determinação da hemoglobina no mesmo animal, em sangue colhido daquela maneira, comparada com a determinação em sangue obtido diretamente de um vaso responderia àquela pergunta. Posteriormente, considerando a pobreza da literatura a respeito e o interesse despertado pelas primeiras determinações, fui levado a estudar melhor o assunto.

No presente trabalho, escolho um método para a determinação da hemoglobina nos ofídios, apresento os resultados obtidos, mostrando, além disso, a existência de uma quantidade apreciável de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) no sangue destes vertebrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados exemplares adultos de *Bothrops jararaca* e de *Philodryas* sp., recém-chegados ao serpentário deste Instituto e ainda não usados até o momento para qualquer outro fim. Somente os animais aparentemente em boas condições de saúde foram utilizados.

A colheita do sangue foi feita na cauda ou na aorta abdominal.

- a) *Na cauda.* Depois de bem lavada corta-se, com tesoura forte, um segmento da cauda, de 3-4 mm de diâmetro na superfície de corte. Com o animal em posição vertical, cabeça para cima, o sangue goteja facilmente. Terminada

(*) Este trabalho foi possibilitado, em parte, graças à benemerência dos drs. A. ALVES FILHO e A. RIBEIRO LIMA, por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas.

a colheita, inverte-se a posição do animal e estanca-se a hemorragia colocando-se uma gôta de percloroeto de ferro mais ou menos a 30 por cento na superfície de corte.

- b) *Na aorta.* Fixado o animal numa prancha de cortiça, faz-se uma incisão ventral na união do terço posterior com o terço médio do animal e a aorta, bem isolada, é alçada com um fio de linha e puncionada introduzindo-se a agulha contra a direção da corrente sanguínea. O sangue é colocado em tubos contendo oxalato de potássio na diluição final de 0.2 g por cento.

Foram empregados os seguintes métodos para a determinação da hemoglobina:

1. Hematina ácida; método de COHEN & SMITH (1919).
2. Hematina alcalina; modificação de WU (1922) da hematina ácida de COHEN & SMITH.
3. Capacidade de fixação do oxigênio: VAN SLYKE & STADIE (1921). O nosso aparelho é agitado a motor e o período de extração dos gases foi sempre de 10 minutos.
4. Determinação do ferro (do sangue ou da hemoglobina). Foi usado o método de PONDER (1942 a), modificação ligeira do WONG original, empregando-se 1 ml de sangue de jararaca ou a quantidade correspondente da hemoglobina pulverizada e sêca. Em determinações anteriores, mesmo com os tempos recomendados por PONDER, obtive alguns filtrados corados e turvos. Este inconveniente foi afastado após adotar como rotina a técnica de deixar ficar o material de um dia para o outro depois da junção da solução saturada de persulfato de potássio.

ESCOLHA DO MÉTODO

Foi tentado, de início, o método da hematina ácida pela facilidade de execução, mas como a diluição do sangue de cobra em HCl 0.1 N dá sempre uma solução muito turva para a colorimetria, foi abandonado o processo. Entretanto, a alcalinização desta solução ácida, turva, com um décimo do volume de NaOH a 10 por cento, dá uma solução límpida, de tonalidade esverdeada, aparentemente utilizável para a colorimetria. O emprêgo do método da hematina alcalina parecia, pois, satisfatório. Para testar a sua precisão na determinação da hemoglobina do sangue dos ofídios foi feita, preliminarmente, uma série de determinações da hemoglobina, no mesmo sangue, pela capacidade fixadora de oxigênio, tomada como padrão e pelo processo da hematina alcalina (Tabela I). As diferenças, grandes e variáveis, observadas na quase totalidade dos casos e, sobretudo, o fato

dos valores serem quase sempre mais altos com a hematina alcalina, fizeram-me pensar na existência de uma quantidade variável de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) no sangue destes ofídios, uma vez que o fato já tinha sido assinalado por AMMUNDSEN (1939, 1941), para o sangue humano normal. Esta possibilidade da presença de hemoglobina inativa afastou, logo de início, o emprêgo da capacidade de oxigênio como método de rotina, ou mesmo como método padrão de comparação.

TABELA I

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pela capacidade de oxigênio e pela hematina alcalina

Caso	Hb g% Capacidade	Hb g% Hematina	Diferença %
1	4.8	5.1	+ 6.2
2	6.6	6.6	0.0
3	5.0	5.1	+ 2.0
4	4.7	5.1	+ 8.5
5	5.1	4.9	- 3.9
6	5.0	5.9	+ 18.0
7	3.8	4.2	+ 10.5
8	4.2	4.2	0.0
9	7.2	7.7	+ 6.9
10	5.7	5.9	+ 3.5
11	5.8	6.3	+ 8.6
12	8.7	9.4	+ 8.0
13	6.0	6.1	+ 1.7
14	6.7	7.0	+ 4.5
15	6.1	6.5	+ 6.6
16	7.6	8.2	+ 7.9
17	4.8	5.7	+ 18.8

O método da hematina alcalina foi, então, comparado com a dosagem do ferro do sangue. A concordância precária entre os dois processos, (Tabela II) tomada naturalmente a dosagem do ferro como a mais precisa, levou-me ao abandono definitivo do método da hematina alcalina. Apesar do elogio ao último método feito recentemente por CLEGG & KING (1942), observei que na determinação das hemoglobinas da jararaca e do cão (PRADO, 1944) os valores encontra-

dos não concordaram com os obtidos pela dosagem do ferro total. Aliás é este o resultado a que chegou PONDER (1942 b), trabalhando com sangue humano.

TABELA II

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pelo ferro total e pela hematina alcalina

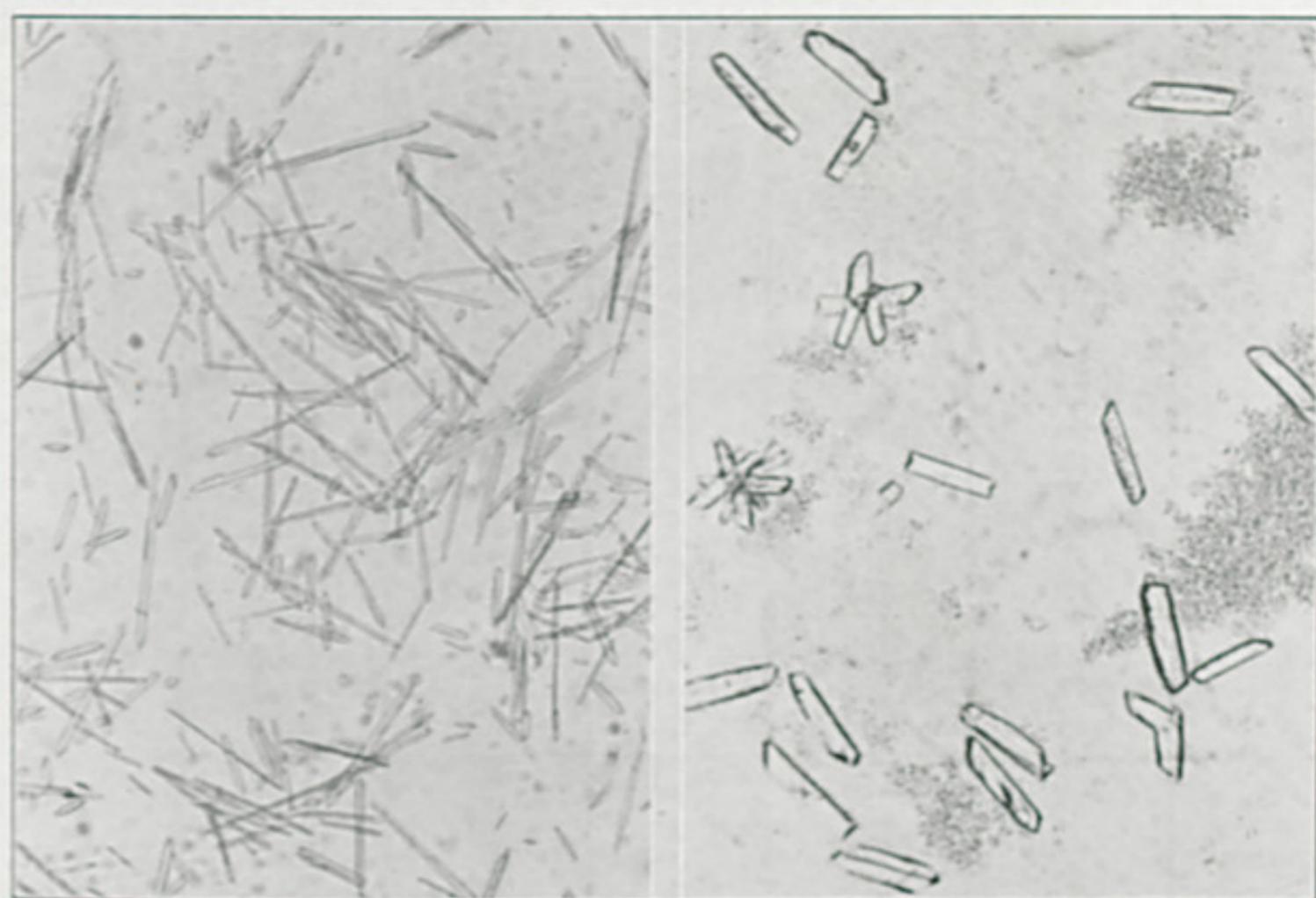
Jararaca N.º	Hb g% Ponder	Hb g% Hem. alcal.	Diferença %
8	6.3	5.3	— 15.9
10	6.6	5.5	— 16.7
11	6.6	5.6	— 15.2
12	6.9	6.9	0.0
23	7.8	6.1	— 21.8
24	7.8	6.8	— 12.8
27	8.1	8.4	+ 3.7
28	8.1	7.0	— 13.6
29	8.1	6.6	— 18.5
33	8.4	7.8	— 7.1
34	8.4	7.1	— 15.5
35	8.4	8.1	— 3.6
36	8.7	8.4	— 3.4
46	9.3	8.6	— 7.5

Diante do exposto, foi escolhido o método de dosagem do ferro total porque me pareceu o único capaz de dar os valores mais precisos no material em estudo. Surgiu, assim, uma última dificuldade; qual a concentração de ferro na hemoglobina da jararaca?

CRISTALIZAÇÃO E PORCENTAGEM DE FERRO NA HEMOGLOBINA DA JARARACA

A transformação das concentrações de ferro total do sangue em mg %, para hemoglobina em gramas por cento, exige que se conheça a porcentagem de ferro na hemoglobina pura. Com esta finalidade, foi tentada a cristalização das hemoglobinas de jararaca e parelheira pelo método de DELORY (1943), usando tolueno como agente hemolisante (HEIDELBERGER, 1922), em substituição ao éter. Em experiências preliminares, este método permitiu, perfeitamente bem, a cristalização da hemoglobina de cão (microfotografia I). A média das determinações de

ferro em três preparações cristalinas de hemoglobina de cão, reduzidas a pó e secas na estufa a 105°C, durante 30 minutos, tratamento este que não altera a sua composição, (MORRISON & HISEY, 1935), foi de 333 mg%. Com o sangue de parrelheiras e jararacas, entretanto, o método de DELORY deixou precipitar muito material amorfo, juntamente com os cristais de hemoglobina (microfotografia II). Repetidas vezes foi tentada a cristalização, variando as concentrações de álcool etílico de 15-35%, mas sempre sem cristalização completa, como no cão. A microfotografia de hemoglobina de jararaca corresponde a uma preparação obtida usando-se álcool na concentração de 16%. Quanto maior a concentração do álcool, maior a quantidade de material amorfo que se precipita. Aparentemente, a hemoglobina destes ofídios é de mais difícil cristalização que a do cão mas, diante dos resultados, parece possível a cristalização completa. A tentativa do processo de DELORY em vários pH talvez resolvesse a dificuldade encontrada.



I

II

Microfotografia dos cristais de hemoglobina.
I) Sangue de cão, II) Sangue de jararaca.

As determinações de ferro nas preparações impuras de hemoglobina de jararaca variaram em torno de 300 mg % e o valor mais alto foi de 306 mg % em uma das preparações. Diante disto e levando em conta que as preparações são, seguramente, impuras, suponho que a porcentagem de ferro na hemoglobina da jararaca deva ser igual, ou muito pouco menor, que a da hemoglobina dos mamíferos.

TABELA III

Concentração de ferro e hemoglobina no sangue de 49 Bothrops jararaca

Jararaca N.º	Pêso g	Sexo	Fe mg %	Hb g %
1	229	♀	15	4.48
2	160	♀	18	5.38
3	370	♀	18	5.38
4	355	♀	20	5.97
5	110	♀	20	5.97
6	115	♀	21	6.27
7	390	♀	21	6.27
8	141	♀	21	6.27
9	125	♀	22	6.57
10	92	♀	22	6.57
11	126	♀	22	6.57
12	215	♀	23	6.87
13	140	♀	23	6.87
14	185	♀	24	7.17
15	170	♀	24	7.17
16	295	♀	25	7.47
17	255	♀	25	7.47
18	490	♀	25	7.47
19	132	♀	25	7.47
20	135	♀	25	7.47
21	213	♀	26	7.77
22	355	♀	26	7.77
23	70	♀	26	7.77
24	150	♀	26	7.77
25	145	♀	27	8.06
26	180	♀	27	8.06
27	285	♀	27	8.06
28	110	♀	27	8.06
29	176	♀	27	8.06
30	183	♀	27	8.06
31	148	♀	28	8.36
32	135	♀	28	8.36
33	268	♀	28	8.36
34	148	♀	28	8.36
35	180	♀	28	8.36
36	160	♀	29	8.66
37	200	♀	30	8.96
38	175	♀	30	8.96
39	273	♀	31	9.26
40	530	♀	31	9.26
41	445	♀	31	9.26
42	144	♀	31	9.26
43	175	♀	31	9.26
44	100	♀	31	9.26
45	80	♀	31	9.26
46	150	♀	31	9.26
47	380	♀	32	9.56
48	118	♂	33	9.86
49	118	♂	33	9.86

30 ♀ e 19 ♂

Médias { Hb 7.80 ± 1.3 g%
Fe 26.1 ± 4.2 mg%

HALL & GRAY (1929) fazem a mesma afirmação referindo-se à hemoglobina dos peixes. Na Tabela III, coluna 5, calculei a hemoglobina a partir da concentração de ferro total do sangue, supondo que na jararaca a hemoglobina contenha 335 mg % daquele elemento. Si esta suposição não corresponder à realidade o erro proveniente deste cálculo não poderá ser maior do que 10%, pois a hemoglobina destes ofídios contém, no mínimo, 306 mg % de ferro.

COMPARAÇÃO DAS DETERMINAÇÕES NA CAUDA E NA VEIA

Em experiências preliminares foi feita uma série de comparações, ainda com o método de hematina alcalina, retirando-se sangue, no mesmo animal, por corte

TABELA IV

Determinações de hemoglobina, nas mesmas jararacas, em sangues de cauda e de veia

Número	Hb g% veia	Hb g% cauda
1	6.2	4.3
2	7.1	3.4
3	6.1	5.6
4	6.3	3.8
5	8.4	6.0
6	6.8	6.2
7	7.8	7.7
8	7.7	6.8
9	6.4	5.8
10	6.0	5.6
11	6.7	5.2
12	4.6	4.8
13	7.2	6.3
14	8.8	7.6
15	7.6	6.0
16	6.2	5.3
17	10.0	9.9
13	4.8	4.4
19	5.5	5.0
20	8.4	6.0
21	8.2	7.1
22	6.2	6.4
23	6.2	5.5
24	6.1	6.8
25	9.1	3.3
Médias	7.0	5.8

da cauda e por punção da veia cava caudal (processo inteiramente semelhante à colheita na aorta). A dosagem de hemoglobina nas duas amostras conduziu aos resultados da Tabela IV. A diluição média de 17 por cento observada em sangue

obtido da cauda tornou obrigatória a colheita em um vaso. A colheita na aorta foi adotada porque permite a retirada de uma quantidade maior de sangue, suficiente para vários exames, o que é mais difícil quando se faz a punção venosa.

CONCENTRAÇÃO NORMAL DE HEMOGLOBINA

Foi determinada a concentração de ferro total do sangue em 49 jararacas adultas, 30 ♀ e 19 ♂. O valor mínimo foi de 15 mg %; o máximo, 33 mg %; a média, 26.1 mg % e o desvio padrão de 4.2 mg %. Os resultados estão na Tabela III, onde se vêem ainda o pêso e o sexo dos animais estudados. Na coluna

TABELA V

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pela capacidade de oxigênio e pelo ferro total. Relações O₂/Fe.

Jararaca N.º	Hb g% Capacidade	Hb g% Ponder	Fe mg %	Capacidade oxigênio	Relação O ₂ /Fe *
2	4.2	5.4	18	5.6	311
3	3.9	5.4	18	5.2	289
4	5.2	6.0	20	6.9	345
7	4.9	6.3	21	6.6	314
13	5.6	6.9	23	7.5	326
14	6.2	7.2	24	8.3	346
15	6.7	7.2	24	9.0	375
16	6.5	7.5	25	8.7	348
17	5.6	7.5	25	7.5	300
18	6.3	7.5	25	8.4	336
21	6.6	7.8	26	8.9	342
22	5.8	7.8	26	7.8	300
25	7.1	8.1	27	9.5	352
26	7.2	8.1	27	9.7	359
30	6.9	8.1	27	9.2	341
31	6.5	8.4	28	8.7	311
37	7.8	9.0	30	10.3	343
38	7.0	9.0	30	9.4	313
39	7.5	9.3	31	10.1	326
41	8.0	9.3	31	10.7	345
42	7.4	9.3	31	9.9	319
43	8.1	9.3	31	10.9	352
47	7.8	9.6	32	10.4	325

* ml de O₂ combinados com 1 g de Fe da hemoglobina.

5 os valores de ferro foram transformados em gramas por cento de hemoglobina. Encontramos os seguintes valores: mínimo, 4.48; máximo, 9.86; médio, 7.80 com um desvio padrão de 1.3. Não houve diferença significativa ligada ao pêso ou ao sexo do animal.

HEMOGLOBINA INATIVA

Para verificar sua presença no sangue de jararaca foi feita uma série de comparações determinando-se a hemoglobina, nas mesmas amostras de sangue, pelo método de ferro total e pela capacidade de oxigênio. As determinações foram feitas logo depois da colheita do sangue. Com os dados obtidos calculou-se o volume de oxigênio, em ml, que se combina a 1 g de ferro da hemoglobina (Tabela V, coluna 6). A média encontrada, 331 ml de oxigênio, foi bem baixa, indicando uma quantidade média de hemoglobina inativa de 17 por cento. O valor mais baixo, 289 ml de oxigênio e o mais alto, 375, indicam, respectivamente, 28 e 6 por cento de hemoglobina inativa.

COMENTÁRIOS

A determinação da hemoglobina no sangue de ofídios pela dosagem de ferro total exige cristalização completa da mesma para verificação da sua concentração percentual precisa de ferro. Além disso, deve estar correta a suposição que o ferro plasmático nestes vertebrados existe em quantidade desprezível em relação ao ferro total, como acontece no homem. Acredito ser este provavelmente o caso. De qualquer maneira, fica determinado o ferro total e os valores poderão ser recalculados a qualquer tempo. Na transformação do ferro em hemoglobina preferi usar ainda a antiga constante (335 mg % de ferro), pois não vejo razão suficiente para usar as determinações mais recentes de BERNHART & SKEGGS (1943) para a hemoglobina humana, ou as de MORRISON & HISEY (1935) para a hemoglobina do cão.

Só fiz as determinações em jararacas e em pequeno número de parelheiras. HALL & GRAY (1929), trabalhando com peixes, observaram uma enorme variação no conteúdo de ferro do sangue de espécie para espécie, salientando uma relação direta entre a atividade do peixe e a riqueza hemoglobínica do sangue. Quanto maior a atividade do peixe, maior o teor de hemoglobina. Seria interessante estudar os ofídios sob o mesmo aspecto. As determinações de hemoglobina no sangue de parelheiras, embora em pequeno número, não figurando porisso no presente trabalho, indicam que nestes vertebrados não parece haver diferenças significativas nos resultados obtidos em exemplares de duas famílias tão distintas — as crotalídeas (jararacas) e as colubrídeas (parelheiras). Numa espécie única os valores de HALL & GRAY são bem constantes. Nas jararacas encontrei uma variação bem apreciável no teor de ferro total do sangue. Entretanto, não acredito ter usado exemplares anêmicos porque 26 deles serviram também para a determinação dos respectivos índices de WINTROBE (VALLE & PRADO, 1944) e como a concentração média da hemoglobina corpuscular foi de 37%, fica afastada aquela possibilidade.

Há muito tempo se sabe que 1 grama de ferro da hemoglobina se combina a mais ou menos 400 ml de oxigênio. Mais recentemente (MARENZI & LIDA, 1938; WEISE, 1937) este valor tem sido recalculado e verificado ser aproximadamente exato. A concordância entre métodos por dosagem de ferro total com métodos por capacidade de oxigênio ou monóxido de carbono era tida mesmo como fato assentado até que AMMUNDSEN (1939), confirmando, aliás, suspeitas anteriores, fez a verificação contrária, determinando, posteriormente, a quantidade de hemoglobina inativa existente no sangue humano normal (AMMUNDSEN, 1941). Esta hemoglobina inativa, cuja natureza química ainda está por determinar, variou de 2-12% em relação à hemoglobina total e esteve presente em 40% das amostras de sangue estudadas. AMMUNDSEN supõe que a hemoglobina inativa seja metahemoglobina ou, talvez, hematina. Nas determinações em jararacas, a grande discordância entre os valores obtidos pelo método do ferro total e pelo processo da capacidade fixadora do oxigênio é explicável, a meu ver, pela presença no sangue destes vertebrados de regular quantidade de hemoglobina inativa. Interessante que o fenômeno foi verificado na totalidade dos vinte e três casos estudados sob este aspecto e a quantidade média de hemoglobina inativa é muito maior do que a encontrada por AMMUNDSEN no homem normal. Embora seja possível encontrar outros vertebrados com maior teor de hemoglobina inativa do que o registrado agora para os ofídios, o aproveitamento deste dado para a análise mais acurada do fato poderá conduzir a melhor compreensão do significado fisiológico da chamada hemoglobina inativa.

CONCLUSÕES

1. O sangue colhido por secção de pequeno segmento da cauda de jararacas ficou diluído em média de 17% em relação ao sangue venoso.
2. Dos métodos estudados, somente a dosagem de ferro total do sangue permitiu a determinação precisa da hemoglobina dos ofídios.
3. A concentração média normal do ferro do sangue de 49 jararacas, 30 ♀ e 19 ♂, foi de 26.6 ± 4.2 mg %.
4. A concentração de ferro da hemoglobina da *Bothrops jararaca* é igual ou pouco menor do que a dos mamíferos. Usando como fator da transformação 0.335 g % de ferro, a concentração média normal da hemoglobina do sangue foi de 7.80 ± 1.3 g %.
5. Foi encontrada uma forma de hemoglobina inativa, isto é, não combinável ao oxigênio, na totalidade de vinte e três casos estudados. A concentração média da hemoglobina inativa foi de 17% da hemoglobina total.
6. O peso ou o sexo do animal não influenciaram significativamente a concentração do ferro total do sangue da jararaca.

RESUMO

O teor de hemoglobina do sangue de ofídios foi determinado em parelhas e jararacas pelos métodos da hematina ácida, da hematina alcalina, pela capacidade fixadora do oxigênio e pela dosagem do ferro total. Somente o método do ferro total deu resultados precisos.

A cristalização da hemoglobina destes ofídios foi tentada pelo processo de DELORY, que, em minhas mãos, produziu cristalização completa da hemoglobina do sangue de cão. Nos ofídios, a cristalização foi parcial e o teor em ferro da hemoglobina assim obtida variou em torno de 300 mg % enquanto que na do cão foi, em média, de 333 mg %. Tomando a porcentagem média de ferro da hemoglobina dos ofídios como sendo a mesma da hemoglobina dos mamíferos e usando o fator de transformação 0.335 g %, a concentração média normal de hemoglobina no sangue da jararaca foi de 7.80 ± 1.3 g %. A concentração média normal de ferro no sangue foi de 26.1 ± 4.2 mg %.

Em todos os casos estudados foi achada uma proporção de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) em torno de 17% da hemoglobina total, cujo significado nestes vertebrados, assim como no homem onde ela aparece em 40% dos sangues estudados, na proporção de 2 a 12%, não está ainda esclarecido.

Pelos resultados das determinações de hemoglobina foi observado que o sangue dos ofídios, obtidos por secção da cauda, se apresentou diluído em média de 17% em relação ao sangue obtido por punção venosa.

Foi ainda verificado que o peso e o sexo dos animais empregados não modificaram significativamente a concentração do ferro total do sangue da jararaca.

ABSTRACT

1. Hemoglobin determinations were made in blood of snakes by four usual methods: acid and alkali hematin, oxygen capacity and a modification of the original Wong's method. Only the iron method could be used accurately. The normal total blood iron concentration of 49 *Bothrops jararaca* (19 ♂ and 30 ♀) was 26.1 ± 4.2 mg%. This value was not influenced by the sex or the body weight.
2. The crystallization of ophidic hemoglobin was tried with the method of Delory and successfully used with dog's blood. Partial crystallization was obtained with an iron content averaging 300 mg%.
3. Assuming the iron concentration of snake's hemoglobin to be the same as in mammals, i.e. 0.335 g %, the normal blood hemoglobin concentration of *B. jararaca* was 7.80 ± 1.3 g %.

4. Within a group of 23 *B. jararaca* the blood samples analysed have shown in all cases an average of 17% of inactive hemoglobin (non-oxygen-combining form).
5. Blood collected by cutting a little segment of the tail of snakes could not be used for hemoglobin estimation in virtue of a mean dilution of 17% compared with venous blood.

BIBLIOGRAFIA

- Ammundsen, E.* (1939). The presence of non-oxygen-combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal individuals. *Science*, **90**, 372-373.
- Ammundsen, E.* (1941). Studies on the presence of non-carbon monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal persons. *J. biol. Chem.*, **138**, 563-570.
- Bernhart, F. W. & Skeggs, L.* (1943). The iron content of human hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **147**, 19-22.
- Clegg, J. W. & King, E. J.* (1942). Determination of hemoglobin by the alkaline hematin method. *Brit. Med. J.*, **2**, 329-333.
- Cohen & Smith.* (1919). *J. biol. Chem.*, **39**, 489; modificado por *B. L. Oser*; citado em *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* (1937). *Practical Physiological Chemistry*, 11th ed., 968 pags., Blakiston, Philadelphia.
- Delory, G. E.* (1943). The preparation and analysis for iron of haemin and hemoglobin. *The Analyst*, **68**, 5-8.
- Hall, F. G. & Gray, I. E.* (1929). The hemoglobin concentration of the blood of marine fishes. *J. biol. Chem.*, **81**, 589-594.
- Heidelberger, M.* (1922). A method for the preparation of crystalline hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **53**, 31-40.
- Marenzi, A. D. & Lida, E.* (1938). Estudio comparativo de los métodos de determinación de la hemoglobina. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **14**, 339-346.
- Morrison, D. B. & Hisey, A.* (1935). The carbon monoxide capacity, iron and the total nitrogen of dog hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **109**, 233-240.
- Ponder, E.* (1942 a). The relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration. *J. biol. Chem.*, **144**, 333-338.
- Ponder, E.* (1942 b). Errors affecting the acid and the alkali hematin methods of determining hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **144**, 339-342.
- Prado, L.* (1944). A ser publicado.
- Valle, J. R. & Prado, L.* (1944). Nota sobre a hematologia dos oídios. Índices de Wintrobe da *Bothrops jararaca*. *Mem. Inst. Butantan*.
- Van Slyke, D. D. & Stadie, W. C.* (1921). Citados em *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* (1937). *Practical Physiological Chemistry*, 11th ed., 968 pags., Blakiston, Philadelphia.
- Wu, H.* (1922). Studies on hemoglobin. I. The advantage of alkaline solutions for colorimetric methods for the determination of hemoglobin. *J. Biochem. (Japan)* **2**, 173. Citado em *Peters, J. P. & Van Slyke, D. D.* (1931). *Quantitative Clinical Chemistry*, 1.^a ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Weise, W.* (1937). Vergleichende Untersuchungen zur Methodik der Hämoglobinbestimmung im Blute. *Biochem. Z.*, **293**, 64-93.

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).