

Y/3-1/10

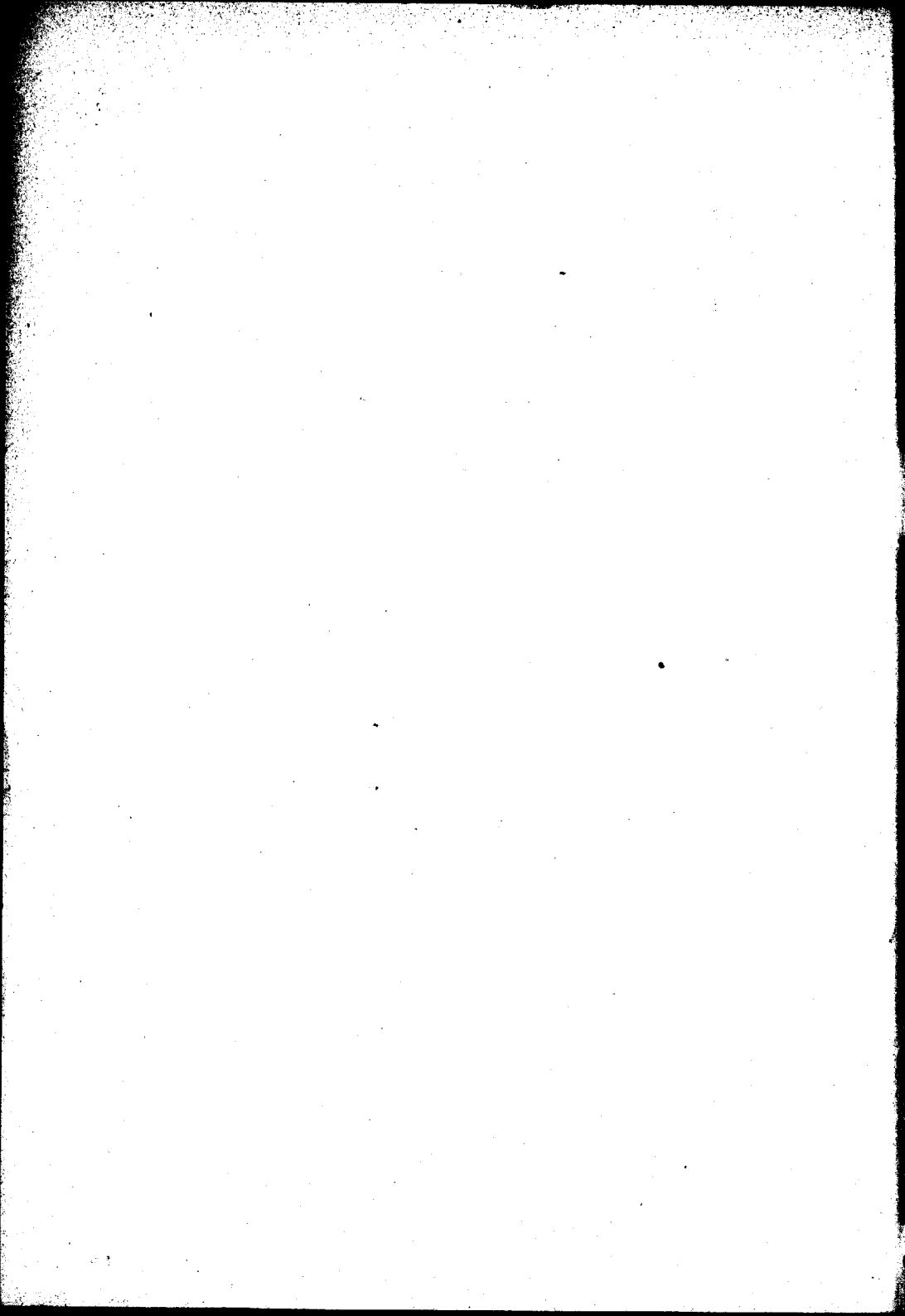
MARIO COPPO

I COMPLESSI LIPIDOPROTIDICI
DEL SIERO.

Estratto dall'ARCHIVIO
PER LO STUDIO DELLA FISIOPATO-
LOGIA E CLINICA DEL RICAMBIO
Anno IX



DITTA TIPOGRAFIA CUGGIANI
ROMA - VIA DELLA PACE, 35
1941-XX



I COMPLESSI LIPIDOPROTIDICI DEL SIERO

MARIO COPPO, Aiuto e l. d.

I componenti elementari del siero (protidi, lipidi, glicidi, elettroliti, acqua) sono in gran parte legati fra di loro a costituire dei complessi molecolari; è verosimile che molte delle attività del siero siano proprie di queste strutture complesse (ad es. attività fermentative e antigeniche). I complessi lipidoprotidici sono, rispetto agli altri complessi del siero, molto importanti, non soltanto quanto a massa, ma anche quanto a valore funzionale.

Vi sono legami lipidoprotidici relativamente semplici e ben definiti, e altri più complicati. Ad es. lo studio di alcuni dei più semplici complessi lipidoprotidici (c. l. p.) ha dimostrato con prove di elettrodialisi, di cataforesi, di ultrafiltrazione frazionata, di precipitazione col metodo della « salatura », che il colesterolo è legato in parte alle globuline, in parte alla albumina. L'euglobulina sarebbe, secondo alcuni AA., un complesso di colesterolo e di una pseudoglobulina.

L'importanza dei c. l. p. a struttura più complicata e meno ben definita, quelli del cui studio ci occupiamo qui, è illustrata dalle considerazioni seguenti.

Il plasma normale che è limpido, contiene in soluzione acquosa perfetta una quantità di lipidi, che se non fosse in qualche modo « occultata », conferirebbe al plasma aspetto francamente torbido.

Questo dimostra che non si tratta di semplici « adsorbati », perchè il complesso non conserva le proprietà originali dei suoi costituenti, ma ne assume di nuove.

È possibile ottenere una soluzione acquosa neutra di c. l. p. che contiene il 30-40 % di lipidi e il 60-70 % di protidi; in altri termini, in presenza di una quantità appena doppia di protidi, i lipidi diventano squisitamente idrosolubili (MACHEBOEUF [1]).

È certo che a parità di massa protidica, i lipidi legati ai protidi manifestano un evidente effetto oncotico: questo fenomeno dimostra che i c. l. p. hanno sugli equilibri di membrana un'azione, che è diversa da quella dei soli protidi e dei soli lipidi, che partecipano alla formazione del complesso.

I c. l. p. hanno una parte importante anche nella struttura del citoplasma: si ritiene che costituiscano il condriosoma. RONDONI [2] ritiene che i c. l. p. del citoplasma, labilissimi, subiscano continue modificazioni, durante lo svolgimento degli atti vitali.

Interessanti risultati, in questo campo di studi, sono stati ottenuti dalla Scuola di M. ASCOLI [3]. Il concetto di « lipidi insaturi disponibili » e cioè estraibili con etere a freddo, può essere ravvicinato a quello di anormale labilità di alcuni c. l. p.. Il « quoziente di disponibilità »

$$\left(R = \frac{\text{valore non saturi totali}}{\text{valore non saturi disponibili}} \right)$$
 può essere considerato un indice della labilità del legame fra lipidi insaturi e protidi. In questa direzione, sono stati ottenuti risultati incoraggianti studiando i lipidi disponibili del siero di soggetti affetti da tumore maligno.

L'importanza dei c. l. p. è molta nel campo della immunologia. A parte la notevole importanza generica dei lipidi in molti fenomeni immunologici (apteni, antigene eterogenetico ecc.) è stato dimostrato che le precipitine del siero antidifterico sono molto probabilmente dei c. l. p. [4].

È possibile che l'occultamento o la fanerosi di lipidi liberi del siero siano causa di sensibili modificazioni della sua fisionomia antigenica. (Nelle classiche esperienze di LANDSTEINER, la funzione antigene organo-specifica è legata al lipide che partecipa alla struttura dell'antigene complesso).

* * *

I primi lavori dedicati espressamente allo studio dei c. l. p. del siero apparvero nel 1932 e sono di MACHEBOEUF e Coll. (SANDOR, DELAGE) [5], [6], [7].

Il fatto fondamentale messo in evidenza da questi AA. è il seguente: se dal siero di cavallo si separano le globuline per salatura con solfato di ammonio, e poi si acidifica la soluzione di albumine a pH 4, si ottiene un precipitato che può essere lavato e ridisciolto in acqua distillata. L'analisi dimostra che il precipitato è costituito per il 60-70 % da protidi e per il 30-40 % da lipidi, legati in un complesso stabile.

L'idea nuova di MACHEBOEUF, che diede un impulso decisivo allo studio dei c. l. p., fu quella di studiarne la struttura e la resistenza attraverso il dosaggio dei lipidi estraibili con una quantità fissa di etere in presenza di quantità progressivamente crescenti di alcool.

Il solo etere a freddo estrae una piccola parte dei lipidi sierici; una estrazione totale si ottiene, come è noto, con alcool e etere bollenti.

Si può preparare una serie di miscugli alcool-eterei, con quantità di alcool scalarmente crescenti: con essi si estraggono dal siero quantità di lipidi progressivamente crescenti, perchè si intaccano sempre più profondamente i c. l. p. resistenti all'azione del solo etere freddo.

Dall'andamento dell'estrazione, si può giudicare della struttura e della stabilità dei c. l. p..

La tecnica originale di MACHEBOEUF [5] fu perfezionata da DELAGE [7]. Nei termini definitivi, essa esige per ogni esperienza 200 cc. di siero, riducibili a 80 con adatti accorgimenti.

Quando nel 1935 intrapresi con alcuni Collaboratori (TRAVIA L., GUALANDI G., MARFORI L., CARDINALI M.) lo studio dei c. l. p. del siero, che mi sembrò aprire un capitolo della biochimica ricco di possibilità (anche e particolarmente per lo studio di argomenti, nei quali la ricerca e il dosaggio dei singoli costituenti del siero avevano fallito) ritenni utile modificare la tecnica dei citati AA., nei punti seguenti:

1) ritenemmo preferibile aggiungere l'alcool al siero anzichè all'etere, affinchè l'alcool prepari i lipidi alla estrazione eterea, con una azione proporzionale alla sua quantità; questa azione « quantitativa » poteva essere menomata dalla diluizione dell'alcool in un volume di etere molto superiore;

2) sembrò opportuno limitare la quantità totale del siero occorrente, affinchè fosse possibile sperimentare su animali di taglia modesta e sull'uomo;

3) fu necessario, di conseguenza, aumentare l'esattezza del metodo, poichè la diminuzione della quantità di siero usata per il dosaggio, comporta un aumento dell'errore possibile.

Con adatte ricerche preliminari, la tecnica per lo studio dei c. l. p. del siero fu da noi sistemata come segue [8].

Ogni curva, diagramma dei c. l. p., è costruita sulla base di 8 punti, corrispondenti ad aliquote del siero in esame, di 4 cc. ciascuna (32 cc. di siero complessivamente per ogni determinazione), più le seguenti quantità di alcool etilico assoluto:

0,0 - 0,2 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 1,0

Con ciò si realizzano le seguenti concentrazioni d'alcool % cc. di siero:

0 - 5 - 10 - 12,5 - 15 - 17,5 - 20 - 25.

Usiamo alcool etilico assoluto Merck, conservato in presenza di CuSO_4 anidro, in bottigliette da 25 cc., sigillate.

Il sangue (circa 70-80 cc.) viene prelevato a digiuno, sterilmente, in provette da centrifuga, che vengono subito poste in termostato a 37° per 45'. Poi le provette sono trasportate in centrifuga, a 2000 giri, per 20'. Si separa il siero e si ricentrifuga. Esso è così pronto per essere messo in lavoro, il che si fa dopo due ore circa dal prelevamento del sangue.

Si preparano 8 imbutoi separatori da 50 cc., col rubinetto leggerissimamente ingrassato (importante evitare ogni eccesso di grasso). La tenuta perfetta si ottiene ponendo in fondo all'imbuto separatore 2-3 gocce di mercurio, che si farà passare anche nel lume del rubinetto. In ogni imbuto separatore si mettono 4 cc. di siero e vi si aggiungono a goccia a goccia, agitando dolcemente, le quantità indicate di alcool. In nessun imbuto si vedrà traccia di intorbidamento. Si lascia riposare per due ore esatte. Si aggiungono poi ad ogni imbuto 10 cc. di etere anidro e si agita, facendo ruotare per 25 volte il liquido nell'imbuto. L'operazione si ripete con intervalli di 6-8 ore per altre tre volte. Dopo sei ore circa dall'ultima agitazione, fatta sempre nel modo indicato, si separa il siero, avendo cura di lasciarne un pò nell'imbuto, onde essere ben sicuri di non perdere nè l'etere, nè lo strato gelatinoso, bolloso, che separa l'etere dal siero.

Il tempo di contatto siero-etere è stato fissato in 30 ore totali circa.

Separato il siero dall'etere con le precauzioni atte — come dicemmo — a lasciare per sicurezza nell'imbuto un pò di siero, si lava per tre volte l'etere con 5 cc. di H_2O ; ciò serve ad eliminare il residuo di siero rimasto nell'imbuto. Indi, lasciando nell'imbuto un piccolo strato d'acqua per sicurezza, si fa passare etere ed acqua in un becker da 50 cc., filtrando per carta, e si lava tre volte l'imbuto separatore con 5 cc. di etere, che si passano per lo stesso filtro. Si trasporta cioè quantitativamente l'etere. È bene, onde evitare che dei lipidi restino sul filtro, che deve essere piccolo, lavarlo ancora due o tre volte con un pò di etere. I beckers sono protetti con garza dalla polvere. L'etere viene eliminato per evaporazione a bagnomaria; poi i beckers vengono posti in stufa a 80° per 12 h., per eliminare l'acqua passata con l'etere. Si lascia raffreddare in essiccatore a H_2SO_4 .

Si preparano frattanto 8 pesafiltri accuratamente essiccati e tarati alla bilancia analitica ($\pm 0,2$ mg.). Si riprende quantitativamente con etere il residuo contenuto nei beckers trasportandolo nei pesafiltri, attraverso carta da filtro comune. Allo scopo servono circa 25 cc. di etere per ogni campione. Segue alla filtrazione il lavaggio con etere del filtro, ripetuto 2-3 volte. I pesafiltri, contenuti alla loro volta in beckers più grandi, onde poterli maneggiare agevolmente, vengono posti a bagnomaria, poi in stufa, poi in essiccatore fino a peso costante.

La pesatura dei pesafiltri dà, per differenza rispetto alla tara, il peso dei lipidi estratti da ogni campione di siero.

Da aliquote di 4 cc. di siero si estraggono col solo etere 1-2 mg. di lipidi. Dal siero trattato con 1 cc. di alcool, quantità di lipidi variabili secondo la specie

cui il siero appartiene, dell'ordine di 10-20 mg. Questi valori si riportano col calcolo a mg. di lipidi estratti % cc. di siero.

La costanza dei risultati che si ottengono ripetendo l'estrazione nelle stesse condizioni di esperimento, è presso che assoluta.

Nello schema seguente riferiamo i valori medi di quelli ottenuti col siero di 13 uomini sani e di 15 conigli normali. L'andamento della estrazione è graficizzato nella fig. 1.

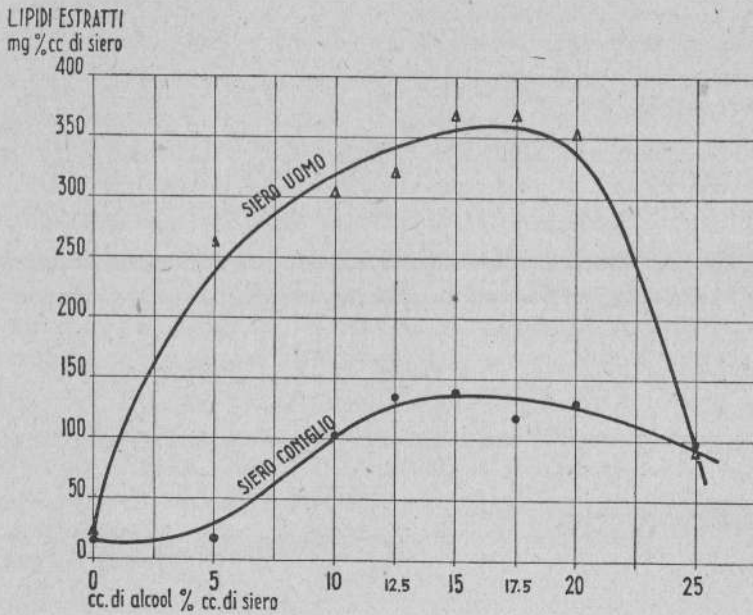


FIG. 1.

Diagramma medio dei c. l. p. del siero.

Specie	Numero dei soggetti	Mg. di lipidi estratti da 100 cc. di siero (concentrazione dell'alcool % di siero)							
		0	5	10	12,5	15	12,5	10	25
Uomo . . .	13	24,5	262,9	302,8	321,5	368,8	367,5	300,1	97,6
Coniglio . .	15	16,8	17,7	101,9	132,5	138,6	118,5	130,6	98,2

Si osserva:

1) un aumento delle quantità estratte a mano a mano che aumenta la concentrazione dell'alcool;

2) un aumento critico dell'estrazione in coincidenza delle concentrazioni d'alcool 5-10 % (7,5 % in media): Esso corrisponde alla risoluzione di alcuni legami lipidoprotidici, che trattengono i lipidi finchè l'alcool non è sufficiente per risolverli. Abbiamo chiamato « punto critico dei legami lipidoprotidici del siero » la concentrazione d'alcool cui corrisponde l'aumento critico dell'estrazione;

3) alle massime concentrazioni d'alcool (20-25 %) si osserva una diminuzione dei lipidi estratti, causata dalla « gelificazione » del siero per azione dell'alcool ad alta concentrazione e che si manifesta con un netto intorbidamento;

4) dal siero umano si estraggono, in media, più lipidi che dal siero di coniglio.

Questi caratteri dell'estrazione, unitamente ad altri di minore importanza, costituiscono gli elementi con cui si valutano i caratteri dei c. l. p. del siero in esame; l'aumento o la diminuzione delle quantità estratte, lo spostamento del punto critico verso le minori o le maggiori concentrazioni di alcool, dimostrano che i c. l. p. si sono modificati nel senso di una maggiore « labilità » o « stabilità ».

Il termine di complesso non va certo esente da critiche. Quello di « semplice » proposto da WILLSTÄTTER [9] presuppone legami chimici attraverso valenze secondarie, non dimostrati nel nostro caso. MACHEBOEUF propose e mantiene il termine di « cenapsi » o giunzioni, che ha il vantaggio di non pregiudicare il modo della congiunzione [10].

Noi manteniamo l'espressione di « complesso », che vale tanto per sistemi chimici ben definiti, quanto per qualunque struttura complessa, indefinita.

* * *

Fino dall'inizio delle nostre ricerche, ci ponemmo il quesito della natura dei protidi e dei lipidi che costituiscono i c. l. p.

Per quanto riguarda il costituente protidico, ricerche non nostre [11], di precipitazione frazionata e di dialisi, hanno dimostrato che si tratta in prevalenza di sieralbumina.

Per quanto riguarda la parte lipidica, ricordiamo che, secondo DELAGE [12], il colesterolo costituirebbe la frazione lipidica prevalente nelle

cenapsi lipidoprotidiche. Altre ricerche, i cui risultati sono riferiti da MACHEBOEUF [1] dimostrano che a tutte le frazioni protidiche restano legati dei lipidi di tutte le frazioni: colesterolo libero, esteri colesterinici, fosfatidi, acidi grassi e grassi neutri.

Anche noi abbiamo intrapreso ricerche sistematiche sulla natura del costituente lipidico dei c. l. p.. Eseguendo il dosaggio dei lipidi totali e delle frazioni lipidiche (metodo di MONASTERIO [13], sul siero originale e su campioni di siero già sottoposti ad estrazione con alcool ed etere secondo il nostro schema per lo studio dei c. l. p., potremmo stabilire quanta colesterina libera ed esterificata, quanti fosfatidi, quanti acidi grassi e grassi neutri si estraggono dal siero colle miscele alcool-eteree da noi proposte (vedi a pag. 3-4).

La conoscenza del contenuto di lipidi totali e di frazioni lipidiche del siero originale, ci permise di stabilire il per cento di lipidi estratto dall'etere per ogni concentrazione di alcool e cioè la quantità e la qualità dei lipidi costituenti i c. l. p. che l'alcool risolve ad una concentrazione determinata.

Ottenemmo risultati particolari diversi nel siero umano e in quello di coniglio. In generale lo studio dei c. l. p. come fu da noi disposto, verte sulla estraibilità — in funzione della concentrazione dell'alcool aggiunto — del 60-70 % dei lipidi totali del siero.

Dal siero di coniglio si estraggono soprattutto grassi neutri e acidi grassi; dal siero umano anche colesterolo libero ed esteri colesterinici, oltre ad acidi grassi e grassi neutri, e cioè campioni di quasi tutte le frazioni lipidiche studiate, come se il c. l. p. fosse più complicato nel siero umano che nel siero di coniglio.

Queste ricerche ci hanno permesso di sostituire concetti più precisi alle espressioni di « lipidi estratti » o di « lipidi estraibili » ad una determinata concentrazione d'alcool, permettendoci di approfondire la conoscenza della struttura dei c. l. p. e del significato delle sue modificazioni.

* * *

Quale prima applicazione di questi concetti e della nostra tecnica, ritenemmo utile prendere in esame le modificazioni dei c. l. p. prodotte dal riscaldamento del siero alla temperatura cosiddetta « critica ». La temperatura di 55-57° è chiamata « temperatura critica del siero » perchè almeno nove delle caratteristiche fisicochimiche del siero (viscosità, potere rotatorio, dispersione rotatoria, assorbimento della luce, tensione

interfaciale, conduttività elettrica ecc.) variano criticamente quando la temperatura tocca i 56° [14]. Queste modificazioni fisicochimiche coincidono, come è noto, con la perdita del potere complementare.

D'ALESSANDRO [15] aveva osservato che la quantità di lipidi « dispo-

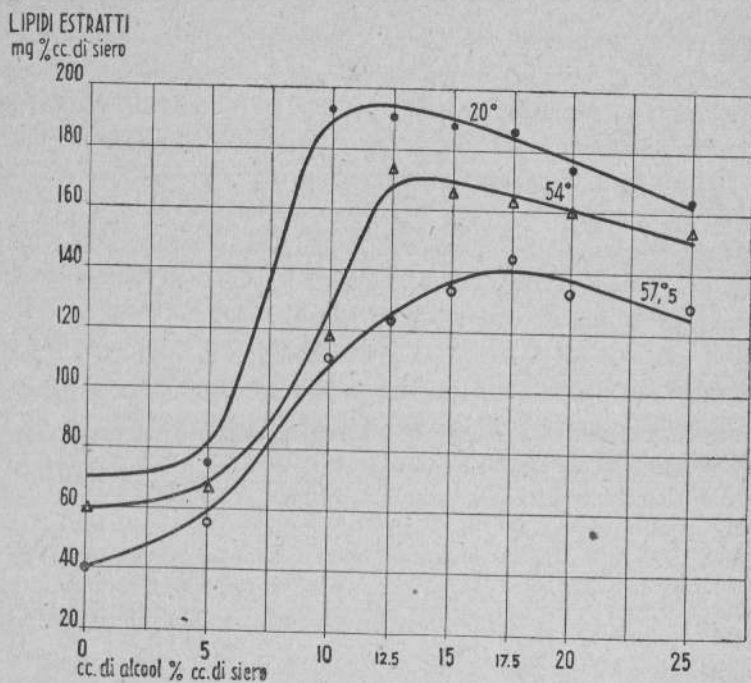


FIG. 2.

Diagramma dei c. l. p. di campioni di siero di cavallo riscaldati a varie temperature.

(Da MARFORI L., « Bioch. e Ter. Sperim. », 25, 116, 1938)

nibili » estratti dall'etere a freddo, diminuisce nel siero riscaldato a 56°. MARFORI [16] ha osservato (vedi fig. 2) che il riscaldamento del siero produce una stabilizzazione generica dei c. l. p., per cui, a mano a mano che la temperatura di riscaldamento cresce per es. da 24° a 64°, si estraggono quantità sempre minori di lipidi, qualunque sia la concentrazione dell'alcool aggiunto al siero.

Approfondendo queste ricerche abbiamo potuto dimostrare, che quando la temperatura tocca o supera 56° si verifica criticamente uno sposta-

mento del « punto critico dei c. l. p. » verso maggiori concentrazioni di alcool (stabilizzazione).

La fig. 3 rappresenta i risultati ottenuti con una delle esperienze di questo gruppo. Abbiamo usato siero di cavallo. Nel siero riscaldato a temperature minori di 56° (20°, 52°, 54°) il « punto critico dei c. l. p. » corrisponde al 7,5 % d'alcool. Nei campioni dello stesso siero riscaldati a temperatura $\geq 56^\circ$, il punto critico corrisponde all'8,75 % d'alcool. La temperatura « critica » produce cioè una stabilizzazione critica di alcuni c. l. p., che si manifesta con una diminuzione della estraibilità dei lipidi [17].

LIPIDI ESTRATTI
mg % cc di siero

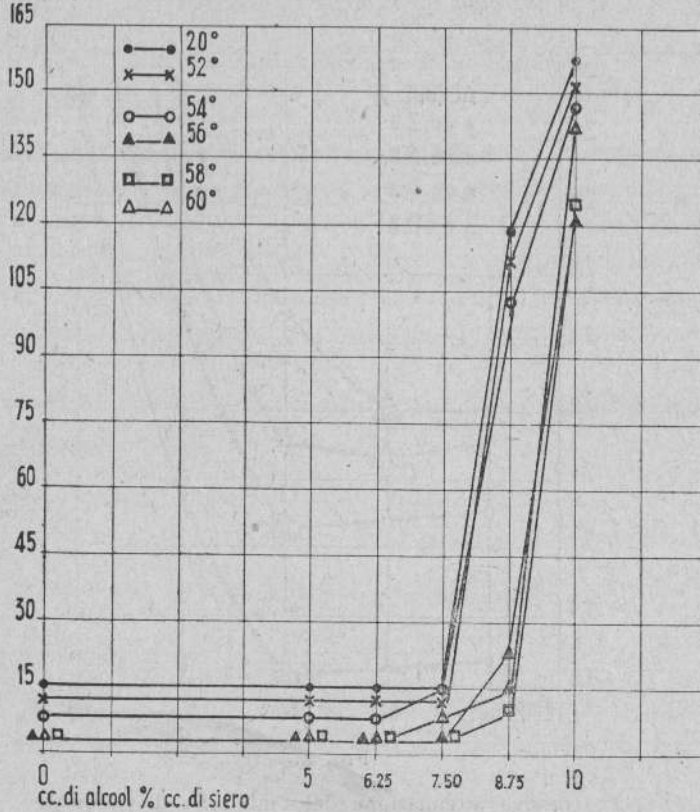


FIG. 3.

Spostamento del punto critico dei c. l. p. del siero
alla temperatura di 56°.

Questo nuovo aspetto delle modificazioni della struttura chimico-fisica del siero prodotte dal riscaldamento a 56°, può avere rapporti con la perdita dell'attività complementare, data l'importanza dei lipidi nei fenomeni immunitari. È difficile proporre una interpretazione molecolare dei fenomeni. LECOMTE DU NOÛY ritiene che l'ipotesi di una brusca idratazione molecolare possa spiegare univocamente la variazione critica a 56° di molte proprietà fisicochimiche del siero [14]. I risultati di nostre misure della tensione oncotica del siero « scomplementato » al calore, sembrano aver confermato, coll'esperimento, quella ipotesi [18].

* * *

L'importanza dei c. l. p. quali vettori di alcuni caratteri fisicochimici del siero, è stata illustrata da ricerche di MARFORI [19].

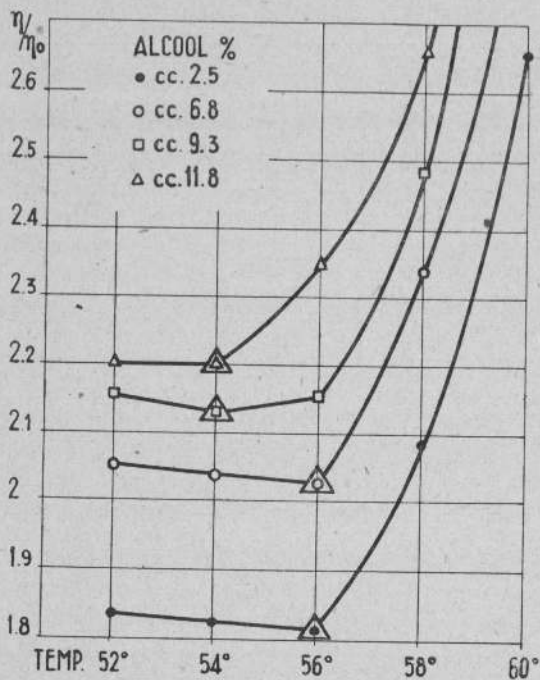


FIG. 4.

Progressiva attenuazione del « minimo » di viscosità, a mano a mano che aumenta la concentrazione dell'alcool usato per l'estrazione alcooleterea, che risolve i legami lipidoprotidici.

(Da MARFORI L., « Bioch. e Ter. Sperim. », 25, 111, 1938)

È noto (LECOMTE DU NOÛY [14] che la viscosità del siero varia con la temperatura, secondo una funzione complessa: la viscosità offre un « minimo » ben netto alla temperatura di 55-56°; il fenomeno è costante e molto evidente.

MARFORI ha ripetuto le misure di viscosità di LECOMTE DU NOÛY, su sieri già sottoposti ad estrazione con i miscugli alcool-eteri scelti a far parte del nostro dispositivo per lo studio dei c. l. p. In altre parole, ha studiato comparativamente il comportamento della viscosità in funzione della temperatura, in campioni di siero, in cui gruppi più o meno numerosi di c. l. p. erano stati preliminarmente risolti.

Risultato: nel siero estratto con quantità d'alcool superiori a 8 cc. per cento di siero, il minimo di viscosità alla temperatura di 56°, è abolito. (Fig. 4).

Questo dimostra che la risoluzione degli strati più superficiali del c. l. p. (queste espressioni hanno solo valore esplicativo) non modifica sensibilmente la struttura chimico-fisica del siero. Se però, tale risoluzione raggiunge una certa profondità, (espressa da concentrazioni d'alcool pari o superiori all'8 %) la struttura chimico-fisica del siero ne è alterata, e il minimo di viscosità a 56° scompare. Via via che aumenta la concentrazione dell'alcool, la viscosità aumenta in funzione della temperatura, secondo una linea che si avvicina sempre di più ad una retta; il comportamento del siero si avvicina cioè sempre di più a quello di un semplice colloide idrofilo.

Queste ricerche ci hanno dunque offerto una elegante dimostrazione dell'importanza dei c. l. p., in quanto vettori di alcuni caratteri strutturali del siero.

Per quanto si riferisce alla importanza dei c. l. p. fra i fattori della « eucolloidità » o « stabilità » del siero, abbiamo eseguito delle ricerche, che dimostrerebbero nel siero Takata-positivo dei c. l. p. più semplici e più labili di quelli del siero normale [20]. Riprenderemo in esame con altre ricerche questi risultati: poichè il fegato elabora e perfeziona alcune frazioni protidiche (fibrinogene) e lipidiche (steridi), è lecito domandarsi se esso operi anche la giunzione fra lipidi e protidi, in cui consiste la formazione dei c. l. p.; la presenza di c. l. p. anormali nel siero di soggetti con fegato profondamente leso (reaz. di Takata positiva), potrebbe avere questo significato.

L'intima natura del legame che unisce lipidi e protidi è stata oggetto di ricerche da parte di MACHEBOEUF e coll.

L'ipotesi formulata per prima in ordine di tempo [5], fu quella di affinità reciproche di catene polimetileniche omologhe; le funzioni idrofile protidiche e le rare funzioni idrofile lipidiche sarebbero orientate verso l'acqua (si ricordino i lavori fondamentali di LANGMUIR e di HARKINS [21], [22], sulla polarità delle molecole disposte in strato monomolecolare e sulle particolari proprietà che esse assumono in tale stato). Attorno ad un nucleo centrale formato da lipidi e protidi legati in tal modo, vi sarebbe uno strato di molecole d'acqua, poco permeabile ai solventi dei lipidi. Questa condizione rende conto dell'apparente occultamento di una parte dei lipidi sierici.

Successive, recenti ricerche di MACHEBOEUF e coll. [23], [24], eseguite studiando l'azione dei saponi e dell'etere sul siero e sulle cenapsi lipido-protidiche presenti nelle singole frazioni protidiche del siero stesso, recano importanti elementi in favore dell'ipotesi surriferita, sulla natura dei legami lipidoprotidici dei complessi l. p. meno stabili. Alcune cenapsi, dotate di particolare stabilità, fanno ritenere che non si tratti sempre di semplice solvatazione di catene polimetileniche, ma talvolta di unione più intima, forse di una vera combinazione chimica fra lipidi e protidi.

La natura chimica del legame lipido-protidico può quindi essere diversa nelle diverse specie di complesso.

*(Pervenuto in Redazione
il 4 luglio 1941-XIX)*

RIASSUNTO. — L'A., prospettata l'importanza dei complessi lipidoprotidici nella struttura fisico-chimica del siero, espone la tecnica adatta al loro studio ed i risultati conseguiti (con alcuni Collaboratori) in un quinquennio di ricerche.

345095

AUTORI CITATI

- [1] MACHEBOEUF M. A., *Les lipides et les substances lipoidiques*. In: POLO-
NOWSKI M., *Exposés annuels de Biochimie Méd.* 1^a Série. Ed. Masson, Pa-
rigi, pag. 223, 1939.
- [2] RONDONI P., *Biochimica*. Ed. U.T.E.T., Torino, 1935, pag. 416.
- [3] ASCOLI M., « *Klin. Wschr.* », 14, 1593, 1935.
- [4] LINDERSTROM-LANG, citato da [1], a pag. 229.
- [5] MACHEBOEUF M. e SANDOR G., « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 14, 1168, 1932.
- [6] SANDOR G., « *Thèse de la Fac. de Sciences de Paris* », n. 2308, 1933.
- [7] DELAGE B., « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 17, 927, 1935.
- [8] COPPO M., TRAVIA L. e GUALANDI G., « *Diagn. Tec. Labor.* », 7, 650, 1935.
- [9] WILLSTAETTER R. e ROHDEWALO M., « *Zeit. f. Physiol. Chem.* », 225, 110, 1934.
- [10] MACHEBOEUF M., *Etat des lipides dans la matière vivante*. Ed. Hermann,
Parigi, pag. 29, 1936.
- [11] MACHEBOEUF M. A. e JANUSKIEWICZ M., « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 19,
~~694~~ 1937.
- [12] DELAGE M. B., « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 19, 1407, 1937.
- [13] MONASTERIO G., « *Fisiol. e Med.* », 5, 435, 1934; « *Boll. Soc. Ital. Biol.*
Sper. », 13, 1176, 1938.
- [14] LECOMTE DU NOÛY P., *La température critique du sérum*. Ed. Hermann,
Parigi, 1936.
- [15] D'ALESSANDRO G., « *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* », 11, 272, 1936.
- [16] MARFORI L., « *Bioch. e Ter. Sper.* », 25, 116, 1938.
- [17] COPPO M. e MARFORI L., « *Annali d'Igiene* », 47, 426, 1937.
- [18] COPPO M. e FENICI A., « *Annali d'Igiene* », 48, 664, 1938.
- [19] MARFORI L., « *Bioch. Ter. Sper.* », 25, 400, 1938.
- [20] COPPO M. e GUALANDI G., « *Boll. Atti R. Acc. Med. Roma* ». 64, 103, 1938.
- [21] LANGMUIR I., « *J. Am. Chem. Soc.* », 38, 2221, 1916.
- [22] HARKINS X. D., « *J. Am. Chem. Soc.* », 39, 541, 1917.
- [23] MACHEBOEUF M. e TAYEAU F., « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 23, 31, 1941.
- [24] — « *Bull. Soc. Chimie Biol.* », 23, 49, 1941.

