

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÁCIDO FOSFÓRICO POR MEIO DA REAÇÃO CERULEO-MOLÍBDICA DE DENIGÈS

POR

Rubens Salomé Pereira

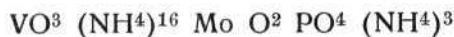
O papel essencial que o fósforo-participador da constituição da matéria viva — desempenha na vida celular, tem determinado numerosas pesquisas orientadas no sentido da elaboração de métodos rápidos, simples, exátos, sensíveis e cómodos, para a determinação quantitativa do ionio PO^4 . Tais processos visam sobretudo a dosagem de compostos organicos extremamente complexos, como os fosfatidos, os nucleoproteidos, etc..

Muito frequentemente são os laboratorios obrigados a fazer, em apertado espaço de tempo, grande número de determinações do fósforo em corpos extremamente pobres desse elemento e dos quais pouco se acha à disposição do analista: os métodos microanalíticos são os que permitem resolver, de modo exáto e relativamente simples, as dificuldades de tal natureza.

KLEINMANN aconselha os processos gravimétricos nos casos em que a quantidade de P^2O^5 seja superior a 25 mgrs.; o método volumétrico de NEUMANN (1) modificado por KLEINMANN (2) quando o anidrido fosfórico não se achar em quantidade inferior a 1 mgr.; a colorimetria, se o peso do P^2O^5 for superior a 0,1 mgr.; e a nefelometria, quando as quantidades forem inferiores a 0,1 mgr..

SATO (3), cujo método longo e trabalhoso não encontrou acolhida na prática, precipita o acido fosfórico pelos sais de uranila e utiliza a côr que o ferrocianeto de potassio dá o precipitado obtido.

MISSON (4), propõe determinar-se o fósforo pela medição da intensidade da côr que se obtem com o vanadato de amônio em presença do fósfomolibdato de amônio, devida à formação dum complexo de fórmula



MURRAY e ASHLEY (5) precisaram certos pontos da técnica desse processo e o empregaram para a determinação espectrofotométrica do fósforo no ferro e no aço.

Os métodos colorimétricos utilizados na dosagem do acido fosfórico, baseiam-se, em geral, na produção da côr azul, graças ao emprego de redutores convenientemente escolhidos. TAYLOR e MILLER (6)

recomendam os sais de hídrazina. KLEINMANN verificou não convir, a fenilhídrazina, às determinações colorimétricas, visto ela causar a turvação do soluto. Se bem que o sulfato de hídrazina e — ainda melhor — o cloreto de hídrazina dêem bela coloração azul-marinho carregada, não se prestam bem à determinação quantitativa do ácido fosfórico, visto não existir proporcionalidade entre a intensidade da côr e a quantidade de fósforo.

Buscando aplicar à dosagem do ácido fosfórico a côr vermelha produzida pelo molíbdeno em solução ácida e em presença de redutores convenientes e do rodanato de potássio, KLEINMANN (7) conclue que, embora a côr seja uma função da concentração, a relação entre essas variáveis não pode representar-se por linha réta: seria necessário traçarem-se curvas empíricas, o que daria ao método feição extremamente laboriosa e delicada. Deve-se também rejeitar o emprego do tanino e dos fenóis — ácido gálico, pirogalol, pirocatequina. KLEINMANN acha que o ferrocianeto de potássio satisfaz plenamente as exigências das determinações que não envolvam quantidades inferiores a 0,1 mgr. de P^2O^5 .

A dosagem do amoníaco no complexo molíbdeno-fosfórico, além de ser muito trabalhosa, não oferece, pelo menos com as técnicas propostas até hoje, meio seguro para se determinar quantitativamente o ácido fosfórico.

BRIGGS (8) usa uma solução sulfúrica de molibdato de amônio, a hidroquinona e o sulfíto de sódio.

FISKE e SUBBAROW (9) recomendam dois reativos molíbdicos de acidez diferente, o sulfíto de sódio, o bisulfíto de sódio e o ácido aminonaftolsulfônico.

VON der HEIDE e HENNIG (10) empregam a solução de azul de molíbdeno preparada de acôrdo com o processo de ZINZADZE (11), (12), (13).

TERADA (14) precipita o ácido fosfórico pelo reativo estrícnomolíbdico, ajunta fenilhídrazina à solução do precipitado e obtém uma côr vermelha de vinho, que ele compara à de padrões conveniêntes. Segundo o autor, os resultados obtidos são satisfatórios no caso de as quantidades de P^2O^5 se situarem entre 0,2-0,06 mgs..

GREENHILL e POLLARD (15) elaboraram um processo para a determinação do fósforo em pequenissimas quantidades de materia vegetal, obtida nas experiências feitas em vasos, e para tanto basearam-se nos trabalhos de FISKE e SUBBAROW: eles incineram a substância em presença de nitrato de magnésio e empregam o ácido sulfúrico 10 N, o molibdato de amônio, o ácido aminonaftolsulfônico. A concentração sulfúrica final deve ser 0,5 N; os reativos são preparados de acôrdo

com as indicações de WARREN e PUGH (16) e com as de FISKE e SUBBAROW: — a côr obtida é comparada à de padrões feitos a partir do fosfato monopotássico.

ROBINSON e WIRTH (17) usam o azul de molibdeno na determinação colorimétrica do ácido fosfórico na água. Esses investigadores acham que o método do sulfíto de hidroquinona e o do ácido aminonaftolsulfônico são satisfatórios somente em presença de porções relativamente grandes de fósforo.

ROEPKE (18) incinera o sêro sanguíneo em presença de nitrato de amônio e de ácido nítrico, dissolve as cinzas em 2,5 cc de ácido sulfúrico 10 N, e em 10-20 cc de água, neutraliza a solução pelo amoníaco, passa-a para um balão de 100 cc, ajunta água até 70-80 cc, 2 cc do reativo sulfomolibdico de Denigès, completa o volume de 100 cc e adiciona 5 cc solução de cloreto estano: ao cabo de 1-2 minutos a côr se compara à de padrões no preparo dos quais se leva em consideração a quantidade de sulfato de amônio.

AMON e HINSBERG (19) recomendam o ácido ascórbico no lugar do aminonaftolsulfônico.

URBACH (20) para dosar o fósforo total, o orgânico e o mineral, incinera a urina segundo o processo de NEUMANN, em tubos de experiências, e para tanto emprega 6-10 gotas de ácido sulfúrico e 1 cc de ácido nítrico. À solução diluída e neutralizada, ele ajunta molibdato de amônio a 5 % em solução sulfúrica normal, hidroquinona a 2 %, bisulfíto de sódio a 7 %, e um reativo feito de sulfíto de sódio a 15 % (500 cc) ajuntando a 2 litros de carbonato de sódio a 20 % — e em seguida determina a extinção dada pelo aparelho de Pulfrich.

BOMSKOV (21) determina o fósforo no sangue por meio do molibdato de amônio (25 grs. de sal, 300 cc de ácido sulfúrico 10 N e água até 1 litro) e do ácido aminonaftolsulfônico a 0,25 %. Após a côr se haver desenvolvido plenamente, ele lê a extinção dada pelo aparelho de Pulfrich.

SIWE (22) dósa o ácido fosfórico em pequeníssimas quantidades de sêro (0,05 cc) por meio do molibdato de amônio a 0,4 % e uma solução de ácido aminonaftolsulfônico preparada do seguinte modo: a 0,5 gr. dêste corpo seco, ajuntam-se 195 cc de bisulfíto de sódio a 15 % e 5 cc de sulfíto de sódio. A extinção é dada pelo aparelho de Pulfrich.

ETIENNE (23) reduz o fósfolibdato de benzidina pelo sulfato de hídrazina e compara a côr obtida à de padrões preparados com o ácido fósfolibdico tratado pelo mesmo redutor.

STEIGMANN (24) usa uma solução glicerinada de gelatina e um reativo molibdico que se prepara pelo adicionár-se a 35 cc de ácido

nitrico d-1,2 uma solução, feita a frio, de 5 grs. de molibdato de amônio em 100 cc de água.

DENIGÈS (25) mostrou que, posto em presença do ácido molibídico e do produto de redução dêste, o ionio PO_4^- , observadas certas condições, fórma um composto fósfoconjugado do molibdeno, de fórmula



que recebeu o nome de *fósfoconjugado ceruleo-molibídico*. Extremamente solúvel nágua, êste corpo tinge o líquido, em cujo seio se fórma, da sua própria côr e permite a determinação quantitativa do ácido fosfórico nas mais variadas substâncias.

O meio molibdoso-molibídico pode obter-se seja pela adição ao soluto fosfórico do reativo sulfomolibídico de Denigès e do cloreto estanoso do mesmo autor, seja pelo ajuntar-se mistura préformada de $Mo O^3$ - $Mo O^2$, seja ainda pelo emprego de dois reativos que se conservam separadamente: — o sulfomolibídico diluído a 25 % — reativo «A» — e o produto da redução de «A» sob a influência do cobre metálico — o que constitue o reativo «B».

Ao passo que o cloreto estanoso deve preparar-se no momento em que se vae empregar e que o reativo molibdoso-molibídico mal se conserva ao cabo de uma semana, a conservação do reativo «B» é muito longa.

De acôrdo com Denigès, o ácido fosfórico, na proporção de 1 mgr. por litro, acusa-se por acentuada coloração azul, ainda perceptível com quantidade dez vezes menor de $PO_4^- H^3$.

— Para se realizar a reação, ajuntam-se a 5 cc da solução fosfórica, 3 gotas de «B» e 6-8 de «A», aquece-se o líquido sôbre uma chama conveniente e mantem-se a fervura durante 12 segundos, após o que se compara à de padrões a côr obtida.

— Por ser o método ceruleo-molibídico de Denigès notavelmente sensível, cômodo, simples, rápido, exáto, e por prestar-se admiravelmente bem aos trabalhos em série, procurámos applicá-lo à determinação espectrofotométrica do ácido fosfórico por meio do espectrofotômetro de Pulfrich.

ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

EXECUÇÃO DO PROCESSO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

Preparação dos reativos: — Empregamos os reativos «A» e «B» de Denigès, que preparamos do seguinte modo:

Reativo «A»: — Em um balão de 500 cc, dissolvem-se nágua fria 6,25 grs. de $Mo^7 O^{24} (NH_4)^6$, 4 H_2O e completa-se o volume. Passa-se a solução assim feita para um balão de 1 litro e ajuntam-se-lhe 500 cc de ácido sulfúrico 10 N.

Reativo «B»: — Num frasco amarelo ou preto, de rólha esmerilhada, põem-se 5 grs. de raspas de cobre não oxidadas, ajuntam-se 100 cc do reativo «A» e deixa-se que o contáto se prolongue durante três horas, pelo menos, antes de se usar o reagente. Durante esse tempo, agita-se o frasco de vez em quando.

Na preparação desses reativos, usamos drogas puras, *pró análise* com garantia, de Merck, ou de Schering-Kahlbaum.

Modo operatório: — Usamos tubos de experiências, de vidro Pyrex, de 20 cms. de comprimento e de 20 mms. de diâmetro, graduados em 1 cc — 2,5 cc — 5 cc — 7,5 cc — 10 cc.

Põe-se quantidade exatamente medida, da solução fosfórica, num tubo, ajuntam-se os reativos «A» e «B» em quantidade conveniente, dilue-se com água a volume determinado, marcado na parede do tubo, arrolha-se êste com rólha atravessada por um tubo de vidro afilado na extremidade superior e mergulha-se em banho-maria fervente até a côr apresentar o máximo de intensidade. Deixa-se a solução esfriar expontâneamente e determina-se a extinção dada pelo espectrofotômetro de Pulfrich, interpondo-se o filtro espectral S 72 e empregando-se uma cuba de capacidade eficaz apropriada. Faz-se ao mesmo tempo um branco, que serve para encher a cuba de compensação.

Influencia da reação da solução fosfórica: — A solução em que se vai determinar o ácido fosfórico, deve ser neutra ou ácida — e neste caso não deve apresentar acidez sulfúrica superior a 0,5 N. Desde que se hajam eliminado os agentes de oxidação, a intensidade da côr se afeta a partir de certa concentração sulfúrica, o que se verifica pelo quadro seguinte:

P ₂ O ₅ mgrs.	Concen- tração sulfúrica	D	k
0,01	—	47,0	0,328
0,01	0,1 N	47,0	0,328
0,01	0,2 N	47,0	0,328
0,01	0,3 N	47,0	0,328
0,01	0,4 N	47,0	0,328
0,01	0,5 N	47,0	0,328
0,01	0,6 N	48,5	0,315
0,01	0,7 N	53,0	0,276
0,01	0,8 N	66,0	0,181
0,01	0,9 N	81,0	0,092
0,01	1,0 N	91,0	0,041

A reação realizou-se com 5 cc da solução fosfórica a que se juntaram os reativos «A» — 0,4 cc e «B» — 0,15 cc.

— Os alcalis acentuam fortemente a côr produzida na reação do ionio fosfórico, mesmo no caso de ser muito leve a alcalinidade da solução, como se vê:

P ₂ O ₅ mgrs.	Concentração alcalina (Na OH)	D	k
0,01	—	47,0	0,328
0,01	0,01 N	43,5	0,362
0,01	0,02 N	40,0	0,398
0,01	0,03 N	36,0	0,444
0,01	0,04 N	33,0	0,482
0,01	0,05 N	26,4	0,578

Influencia do líquido de compensação: — O reativo «B» comunica à solução em que se acha, certa capacidade de absorção, o que não deixa de influir sobre os resultados da dosagem, e que assim se exprime em relação à água destilada:

Quantidade de reativos em 5 cc de volume total		D	E	k
“A” cc	“B” cc			
0,40	0,00	100	0,000	0,000
0,40	0,05	89	0,051	0,010
0,40	0,10	80	0,097	0,019
0,40	0,15	73	0,137	0,027
0,40	0,20	64	0,194	0,039
0,40	0,25	57	0,244	0,049

O uso do branco em lugar da água destilada, como líquido de compensação, é, pois, indispensavel, o que se confirma pelas determinações seguintes:

P ₂ O ₅ mgrs. %	Líquido de compensação	D	k
0,2	Água destilada	41,5	0,382
0,2	Branco	43,5	0,362

Poder-se-ia julgar, talvez, que conviesse empregar a água como líquido de compensação, à vista de se usarem sempre as mesmas quantidades de reativos em determinado volume final: o fato, porém, de o produto de redução — «B» — poder, com o passar do tempo, tornar-se de mais fraco título de molibdeno reduzido, graças à oxidação espontânea, leva-nos a fazer sempre o branco.

Influencia do volume com que se executa a reação: — Si se mantiver a relação — 0,4 cc: 0,15 cc para o volume total de 5 cc — entre os reagentes «A» e «B», os resultados analíticos não se alteram pela mudança do volume final, variável dependente da concentração fosfórica da solução, como o demonstra o quadro seguinte:

P ² O ⁵ na solução	Volume total	Quantidade de reativo		D	k
		“A”	“B”		
mgrs.	cc				
0,01	2,5	0,20	0,075	43,5	0,724
0,01	5,0	0,40	0,15	43,5	0,362
0,01	10,0	0,80	0,30	43,5	0,181

Influencia do tempo de aquecimento em banho-maria: — O ferver-se o líquido pelo aquecimento diréto na chama do bico de Bunsen, dá, muito frequêntemente, origem a projeções que determinam a perda da análise. Preferimos fazer o aquecimento em banho-maria fervente, em que mergulhamos o tubo durante 5 minutos, pelo menos, tempo suficiente para a côr atingir o máximo de intensidade, como o demonstra o quadro seguinte:

P ² O	Tempo de aqueci- mento em minutos	D	k
0,40	1	37	0,432
0,40	2	29	0,538
0,40	3	25	0,602
0,40	4	20	0,699
0,40	5	19	0,721
0,40	6	19	0,721
0,40	7	19	0,721
0,40	8	19	0,721
0,40	9	19	0,721
0,40	10	19	0,721

A partir de 5 minutos, os resultados são constantes e inutil se torna mais prolongado aquecimento, o que, aliás, nenhum inconveniente apresenta.

Influencia do Fe III: — Os sais ferricos, bem como os corpos capazes de determinar a oxidação do molibdeno reduzido, do reativo «B», impedem, quando presentes em quantidade suficiente, a produção da cor — ou, pelo menos, lhe atenuam a intensidade. É, pois, indispensavel eliminar-se essa influencia perniciosa, e para tanto o Fe III deve reduzir-se a Fe II.

Essa redução realizamô-la em tubos de experiências a que se adaptam rôlhas furadas e atravessadas por um tubo de vidro de extremidade superior afilada, e por meio de folhas delgadissimas, de alumínio, de 0,01 gr. de peso: — acidula-se a solução fosfórica, em que tambem se acha o ferro, com ácido sulfúrico titulado e exatamente medido, de sorte que a acidês, uma vez feito o volume total, não seja superior a 0,5 N; ajunta-se uma folha de alumínio, ajusta-se a rôlha ao tubo e mergulha-se êste em banho-maria fervente. Ao cabo de 20-30 minutos, a redução acha-se, em geral, terminada e todo o alumínio metálico desaparece — fáto que bem se deve observar. Resfria-se em seguida a solução, adicionam-se-lhe os reativos «A» e «B» e continua-se a operação como de ordinário. Faz-se um branco e emprega-se a técnica operatória descrita.

Assim procedendo, obtivemos os resultados seguintes:

P ₂ O ₅	Fe III	D	k
mgrs. %	mgrs. %		
0,40	0,00	19	0,721
0,40	20,00	19	0,721
0,40	40,00	19	0,721
0,40	50,00	19	0,721
0,40	60,00	19	0,721

Tal processo pode aplicar-se a soluções fosfóricas em que se encontrem 50 mgrs. — e mais — de Fe III em 100 cc: os resultados obtidos são tão bons quanto os conseguidos na ausencia completa do Fe III.

Levando-se em conta a pequeníssima quantidade de substância empregada na determinação espectrofotométrica do ácido fosfórico, as probabilidades de, pelo menos nas análises biológicas, o Fe III se apresentar em quantidade superior a 50 mgrs. % no soluto, são excepção-

nais: mesmo nesses casos, podem-se obter números tão aproveitáveis como os que se conseguem na ausência dos sais ferricos.

A lei de Lambert — Beer — Determinação do coeficiente numérico: — Na determinação espectrofotométrica do ácido fosfórico por meio da reação ceruleo-molíbdica de Denigès, a lei de Lambert — Beer é perfeitamente válida, pelo menos nos limites uteis do método. É, pois, possível determinar-se a percentagem do ácido fosfórico numa solução, pela multiplicação dos valores da extinção por uma constante, o que, evitando a construção de curvas empíricas, fastidiosas, torna o trabalho muito mais simples e muito mais cômodo.

O quadro seguinte demonstra que a relação entre a concentração e o coeficiente de extinção — k — se traduz por uma réta, o que permite determinar-se o coeficiente numérico:

P_2O_5 mgrs. %	D	E	k	
0,01	81,0	0,092	0,018	0,555
0,02	66,0	0,181	0,036	0,555
0,03	54,0	0,268	0,054	0,555
0,04	44,0	0,357	0,071	0,563
0,05	36,0	0,446	0,089	0,562
0,06	29,0	0,538	0,108	0,555
0,07	23,0	0,638	0,128	0,543
0,08	19,8	0,703	0,141	0,567
0,09	15,8	0,801	0,160	0,562
0,10	66,0	—	0,181	0,552
0,15	54,0	—	0,268	0,560
0,20	44,5	—	0,352	0,568
0,25	35,8	—	0,446	0,560
0,30	28,6	—	0,544	0,551
0,35	23,4	—	0,631	0,554
0,40	19,0	—	0,721	0,555
0,45	15,5	—	0,810	0,555
0,50	12,4	—	0,907	0,551
0,60	29,0	0,538	1,076	0,557
0,70	23,0	0,638	1,276	0,548
0,80	19,5	0,710	1,420	0,563
0,90	15,5	0,810	1,620	0,555
1,00	12,4	0,907	1,814	0,551
Média				0,556

donde se verifica ser o êrro «standard» :

$$\sqrt{\frac{\sum (d)^2}{n (n - 1)}} = 0,0013$$

Persistencia da côr: — A côr mantém-se inalterada longo tempo após haver-se produzido — 24 horas, pelo menos — se não se encontram, na solução fosfórica, corpos oxidantes em quantidade suficiente para exercer ação descorante sôbre o fósfoconjugado e para justificar o trabalho prévio de redução, como o demonstra o quadro seguinte:

P ₂ O ₅	Leitura feita após horas	k
mgrs. %		
0,5	1/4	0,90
0,5	1/2	0,90
0,5	1	0,90
0,5	3	0,90
0,5	6	0,90
0,5	12	0,90
0,5	24	0,90

Si o Fe III, por ex., se achar presente em quantidade sensível, capaz de impedir o aparecimento da côr, ou de, pelo menos, lhe atenuar a intensidade, é necessário reduzi-lo a Fe II: a ação do oxigênio, exercendo-se então sôbre êste, no sentido de o fazer voltar ao estado férrico, determina muito mais rápida descoração do líquido, como se vê em seguida:

P ₂ O ₅	Fe III	Leitura feita após horas	k
mgrs. %	mgrs. %		
0,5	50,0	1/2	0,90
0,5	50,0	1/4	0,90
0,5	50,0	1	0,90
0,5	50,0	2	0,85
0,5	50,0	3	0,65

Reprodutividade dos resultados. Comparação com o método volumétrico de Neumann modificado por Kleinmann: — Os resultados obtidos pelo emprego do método espectrofotométrico que propomos,

são perfeitamente reprodutíveis e comparáveis aos oferecidos por processos bem conhecidos. Para o verificar, fizemos oito determinações espectrofotométricas do ácido fosfórico em uma só amostra de leite e comparámos os dados conseguidos com os números fornecidos pelo processo de Neumann modificado por Kleinmann:

Mgrs. de leite	VOLUME final	k	P ² O ⁵ no leite
	cc		%
2,21	5	0,14	0,176
3,32	5	0,22	0,184
4,42	5	0,29	0,182
5,53	5	0,37	0,184
6,64	5	0,44	0,184
7,75	5	0,51	0,183
8,85	5	0,58	0,182
10,85	5	0,72	0,184
Media			0,182

o que nos dá o êrro máximo de 0,006 e o êrro relativo de 0,033.

Pelo processo de Neumann — Kleinmann, a percentagem de P²O⁵ achada no mesmo leite, foi de 0,179.

ALGUMAS APLICAÇÕES DO MÉTODO

Se bem que o processo espectrofotométrico de que trata o presente trabalho, encontre aplicações muito variadas, nos exemplos que se seguem empregámo-lo apenas na determinação de várias fórmulas do fósforo no plasma sanguíneo, tendo unicamente em vista a aplicação do método estudado. Essas determinações vão, pois, a título de exemplo de aplicação do processo. O estudo da extração e do isolamento das várias frações do fósforo sanguíneo, escapa inteiramente ao fim que temos em vista no momento, visto ser assunto que pretendemos estudar em trabalhos futuros.

DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO TOTAL, DO FÓSFORO LIPÓIDICO E DO FÓSFORO ÁCIDO-SOLUVEL, NO PLASMA SANGUÍNEO.

Fósforo total: — A determinação do fósforo total compreende as duas fases seguintes:

- a) — destruição da matéria orgânica;
- b) — dosagem do fósforo no licor resultante do tratamento feito em (a).

a) *Destruição da matéria orgânica:* — Realisamo-la pelo método nitroperclórico (26), (27), da seguinte fórmula:

Num tubo de experiências, de vidro Pyrex, de 20 cms. de comprimento e de 20 mms. de diâmetro, graduado em 2,5 cc — 5,0 cc, introduzem-se 0,01 cc — 0,05 cc de plasma e 2 cc da mistura nitroperclórica (3:1). Aquece-se em chama pequena, sob agitação constante, na capela, até o aparecimento de vapores densos, de ácido perclórico. Dada a pequenissima quantidade de substância submetida à incineração, o líquido, em geral, não se carbonisa; se, porém, tal se der, ajuntam-se algumas gotas da mistura oxidante, aguarda-se o fim da ebulição que em geral se produz então, aquece-se até *secura* e após até eliminação total do ácido perclórico. Após se haver resfriado o tubo, ajunta-se 1 cc de ácido sulfúrico 0,5 N e aquece-se para bem se dissolverem as cinzas.

b) *Dosagem do fósforo contido na solução das cinzas*: — À solução das cinzas ajuntam-se os reativos «A» e «B» na proporção de 0,4 cc e 0,15 cc respectivamente, para o volume total de 5 cc, completa-se o volume com água destilada, adata-se ao tubo uma rôlha atravessada por um tubo de vidro de extremidade superior afilada e mergulha-se em banho-maria fervente em que é deixado durante 5-10 minutos. Deixa-se que o resfriamento se faça espontaneamente e determina-se a extinção dada pelo aparelho de Pulfrich, interpondo-se o filtro espectral e usando-se um branco como líquido de compensação.

Assim procedendo, obtivemos os resultados seguintes:

Quantidade de plasma	Volume total	E	k	P ₂ O ₅	P
cc	cc			mgrs. %	mgrs. %
0,01	2,5	0,84	0,168	23,35	10,21
0,02	5,0	—	0,170	23,63	10,33
0,04	5,0	—	0,340	23,63	10,33
0,05	5,0	—	0,420	23,35	10,21

Fósforo lipídico: — Num balão de 5 cc — 10 cc põem-se 1,5 cc — 3,0 cc — 6,0 cc da mistura etéreo alcoolica (1 de éter: 3 de alcool a 95°) e, em seguida, 0,05 cc — 0,10 cc — 0,20 cc de plasma, agita-se o frasco e mergulha-se em banho-maria até iniciár-se a ebulição que se prolonga durante 1 minuto. Completa-se o volume do balão com quantidade suficiente da mistura dos solventes, filtra-se o líquido, afim de se separar o coágulo — e para tanto usa-se leve sucção — passa-se o filtrado para um tubo de experiências de vidro Pyrex, graduado em 5 cc, evapora-se até *secura*, em banho-maria, mineraliza-se o resíduo de acôrdo com a técnica descrita anteriormente e dosa-se o fósforo como no caso do fósforo total.

Como se vê, a extração foi feita de acôrdo com as recomendações de BLOOR (28).

Por esse processo, obtivemos os numeros seguintes:

Quantidade de plasma	VOLUME total	k	P
cc	cc		mgrs. %
0,05	5	0,23	5,59
0,10	5	0,46	5,59
0,20	5	0,91	5,53

Fósforo ácido — solúvel: — Num tubo pequeno, de centrifugação, põem-se 0,5 cc — 1,0 cc — 2,5 cc duma solução de ácido tricloracético a 20 % e 0,1 cc — 0,2 cc — 0,5 cc de plasma. Após bem agitar-se o tubo, centrifuga-se energeticamente e decanta-se o líquido limpo sobrenadante. Ao precipitado ajunta-se ácido tricloracético (1 cc — 2 cc) agita-se a mistura e centrifuga-se bem: o líquido de lavagem adiciona-se da primeira centrifugação, posto num tubo de experiências de vidro Pyrex, graduado em 5 cc. Repetem-se as operações de lavagem: e após reunirem-se todos os líquidos no mesmo tubo graduado, evapora-se a solução até secúra, mineraliza-se o resíduo pela mistura nitroperclórica e dósa-se o fósforo de acôrdo com a técnica descrita.

Assim procedendo, obtivemos os seguintes resultados:

Quantidade de plasma	VOLUME total	E	k	P
cc	cc			mgrs. %
0,10	5	—	0,20	2,43
0,20	5	—	0,40	2,43
0,50	5	0,51	1,02	2,48

CALCULO DOS RESULTADOS

Para calculár-se como $P^{2}O^{5}$ a percentagem de fósforo numa determinada substância, emprega-se a formula seguinte:

$$\text{mgrs. \% de } P^{2}O^{5} = \frac{0,556 \times k \times V}{v}$$

e para determinar-se como P, a que se segue:

$$\text{mgrs. \% de P} = \frac{0,243, \times k \times V}{v}$$

em que

k = coeficiente de extinção;

V = volume total com que se realiza a reação;

v = volume da substância posto em análise (em cc).

No caso de ser o peso o elemento a levar-se em consideração, as formulas serão as seguintes, em que p representa o peso da substância submetida à análise:

$$\text{mgrs. } \% \text{ de P}^2\text{O}^5 = \frac{0,556 \times k \times V}{P};$$

$$\text{mgrs. } \% \text{ de P} = \frac{0,343 \times k \times V}{P}$$

Na solução em que se vai determinar o ácido fosfórico pelo método proposto — e que deve ser inicialmente incolor e limpida — não se devem encontrar corpos capazes de lhe comunicar côr própria, como os sais de cobre, por ex., pelo menos em quantidade que permita fazer-se sentir essa ação perturbadora. No líquido fosfórico não deve haver, igualmente, corpos oxidantes, nem redutores, nem o AsO^4 . Este dá reação colorida como o fósforo, posto sob as mesmas condições. As observações acima ressaltam das determinações e das considerações feitas no decorrer do trabalho que ora se publica.

RESUMÉ

Le rôle important du phosphore dans la vie cellulaire a depuis longtemps suscité les efforts des chimistes dans le but d'obtenir une méthode précise de dosage de cet élément dans les composés organiques où il existe le plus souvent en très petite quantité. Après avoir passé en revue les différents procédés qui ont été successivement recommandés jusqu'ici, l'auteur expose ses propres recherches, basées sur la réaction indiquée par Denigès de l'ion phosphorique sur l'acide molybdique.

Dans certaines conditions il se forme un composé phosphoconjugué du molybdène — appelé par Denigès: phosphoconjugué céru-léo-molybdique — très soluble dans l'eau à laquelle il communique une couleur bleue particulièrement avantageuse pour les dosages colorimétriques.

La comparaison de la teinte obtenue avec une gamme d'étalons déterminés permet de connaître facilement la concentration de l'ion phosphorique.

Appliquant à cette mesure le photomètre de Pulfrich, la précision de ce procédé est grandement augmentée.

Le mode opératoire auquel l'auteur s'est arrêté est le suivant:

— On prépare les réactifs suivants:

Réactif A — Sulfo-molybdique dilué: — On dissout 6,25 gr. de Mo^7O^{24} (N H^4)⁶, 4 H^2O dans l'eau froide et on étend à 500 cc. Aux 500 cc de la solution on ajoute 500 cc d'acide sulfurique 10 N.

Réactif B — Molybdeux: — On met dans un flacon jaune ou noir bouché à l'émeri, 5 gr. de tournure de cuivre non oxydée, on ajoute 100 cc du réactif A, on laisse en contact pendant 3 heures au moins en agitant de temps en temps.

La réaction s'effectue dans des tubes d'essai de verre Pyrex, de 20 cms. de longueur et 20 mms. de diamètre, gradués à 1 cc — 2,5 cc — 5 cc — 7,5 cc — 10 cc. On met une quantité exactement mesurée de la solution phosphorique dans le tube d'essai, on ajoute de les réactifs A et B en quantités convenables, on étend à un volume déterminé, on ferme avec un bouchon traversé par un tube de verre effilé à partie supérieure et l'on plonge dans un bain marie bouillant jusqu'à ce que la couleur atteigne son maximum d'intensité.

Un essai à blanc préparé avec la même technique opératoire sert comme liquide de compensation.

Dans le dosage spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction céruléo-molybdique de Denigès, la loi de Lambert — Beer est parfaitement vérifiée dans les limites utiles de la méthode. Il est donc possible de déterminer la concentration de l'acide phosphorique d'une solution en multipliant les valeurs obtenues de l'extinction par un facteur constant, ce qui évite la construction de courbes d'étalonnage empiriques.

L'auteur donne ensuite les résultats qu'il a obtenu en dosant le phosphore total, le phosphore lipoidique, le phosphore acido-soluble dans le plasma sanguin.

SUMMARY

In the study of many types of biological materials, it has become of increasingly importance to stimate accurately rather small quantities of phosphorus. The need of such methods is necessitated frequently by tissues, portions of organs or compounds which, by nature of its occurence, can only be obtained in extremely minutes quantities. The investigator is then confronted with the problem of development of a method of estimation which is capable of accurately and easily estimating minutes quantities of phosphoric acid.

After a brief review of literature relating to colorimetric determination of phosphorus in a variety of materials, the writer esteems that the one worked out by Denigès appeared to be most worth studying with consideration of making photometric readings.

After studying the influence of some factors upon the development of the colour, such as reaction of the phosphoric solution, warming in

boiling water bath, quantities of the reagents, volume, comparison liquid, oxydising and reducing agents, etc., the writer describes the following general procedure:

Two reagents — «A» and «B» after Denigès — are prepared as follows:

Reagent «A»: — Dissolve 6,25 grams of $\text{Mo}^7 \text{O}^{24} (\text{N H}^4)^6$, 4 H^2O in cold water and make the volume up to 500 cc. Add 500 cc of 10 N sulfuric acid.

Reagent «B»: — Into a 125 cc glass-stoppered flask, yellow black in colour, weigh 5 grams of pure, non oxydised copper turnings, add 100 cc of «A», shake repeatedly. After 3 hours the reagent is ready for use.

The colourless phosphoric solution, neutral or of sulfuric acidity not above 0,5 N, is exactly measured into a Pyrex test tube 20 cms. long by 20 mms. wide, graduated at 1 cc — 2,5 cc — 5 cc — 7,5 cc — 10 cc, the reagents «A» and «B» — 0,40 cc of «A» and 0,15 cc of «B» for a total volume of 5 cc — are added, the volume made up conveniently, the test tube stoppered by means of a cork with a central hole to which is fitted a slender glass tube very like a Pasteur pipette in form. After thoroughly mixed the contents, the test tube is plunged into a boiling water bath for 5 - 10 minutes spontaneously. A cell of convenient length, of the Pulfrich step-photometer is filled with the blue coloured liquid and the extinction measurement is made with the spectral filter S 72.

A blank experiment carried out simultaneously serves as comparison liquid.

The colours system follows Lambert — Beer's law, at least within the limits of the method, so that it is not necessary to draw curves or tables of values.

Copper, when present in proportion capable of impressing its own colour upon the system, as well as AsO^4 , oxydising and reducing agents, must all be removed. In the amounts usually present in biological materials even those interfering substances do not disturb. The results agree very closely with those given by the Neumann's procedure as modified by Kleinmann.

The colours is stable for 24 hours or more.

The chiefly advantages of the proposed procedure are: simplicity, rapidity, reagent economy, accurate consonant with that of other microchemical process, two easily made and inexpensively reagents, applicability with minor variation to a wide variety of materials.

The method can be used for the determination of 0,05 γ — 100 γ P. Details and applications are given.

BIBLIOGRAFIA

- 1) — NEUMAN, A. — 1902, 1905 — *Zeitschr. physiol. Chem.* 37, 115; 43, 32.
- 2) — KLEINMANN, H. — 1919 — *Biochem. Zeitschr.* 99, 95.
- 3) — SATO, A. — 1918 — *Journ. of Biol. Chem.* 35, 473.
- 4) — MISSON, G. — 1908 — *Chem. Ztg.* 32, 633.
- 5) — MURRAY, W. M. e ASHLEY, S. E. Q. — 1938 — *Ind. and Eng. Chem.* (Anal. edit.) 10, 1.
- 6) — TAYLOR e MILLER — 1914 — *Journ. of Biol. Chem.* 17, 531.
- 7) — KLEINMANN, H. — loc. cit.
- 8) — BRIGGS, A. P. — 1922, 1924 — *Journ. of Biol. Chem.* 53, 13; 59, 255.
- 9) — FISKE, C. H. e SUBBAROW, Y. — 1925 — *Journ. of Biol. Chem.* 66, 375.
- 10) — VON DER HEIDE, C. e HENNIG, K. — 1933 — *Zeitschr. Unters. Lebensmit.* 66, 344.
- 11) — ZINZADZE, R. — 1930 — *Zeitschr. Pflanzenernähr.* 16, 129.
- 12) — ZINZADZE, R. — 1931 — *Bull. Soc. Chim. France.* 49, 872.
- 13) — ZINZADZE, R. — 1932 — *Zeitschr. Pflanzenernähr.* 23, 447.
- 14) — TERADA, Y. — 1924 — *Biochem. Zeitschr.* 145, 426.
- 15) — GREENHILL, A. W. e POLLARD, N. — 1935 — *Journ. Soc. Chem. Ind.* 54, 404.
- 16) — WARREN, R. G. e PUGH, A. J. — 1930 — *Journ. of Agric. Sci.* 20, 532.
- 17) — ROBINSON, R. J. e WIRTH, H. E. — 1935 — *Ind. and Eng. Chem.* (Anal. edit.) 7, 147.
- 18) — ROEPKE, R. R. — 1935 — *Ind. and Eng. Chem.* (Anal. edit.) 7, 78.
- 19) — AMMON, R. e HINSBERG, K. — 1936 — *Hoppe Seyler's Zeitschr. physiol. Chem.* 239, 207.
- 20) — URBACH, C. — 1931, 1931, 1934 — *Biochem. Zeitschr.* 239, 28; 239, 182; 268, 457.
- 21) — BOMSKOV, C. — 1932 — *Hoppe Seyler's Zeitschr. physiol. Chem.* 210, 67.
- 22) — SIWE, S. A. — 1935 — *Biochem. Zeitschr.* 278, 437.
- 23) — ETIENNE, H. — 1936 — *Bull. Soc. Chim. Belgique.* 45, 516.
- 24) — STEIGMANN, A. — 1936 — *Chem. Ztg.* 60, 12.
- 25) — DENIGÈS, G. — CHELLE, L. e LABAT, A. — 1930 — *Précis de Chimie Analytique* 6ème edit. — Paris. — Maloine.
- 26) — LEMATTE, L., BOINOT, G., KAHANE, E. e Mme. KAHANE — 1932 — *Comp. rend. Acad. Sciences.* 192, 1459.
- 27) — E. KAHANE — 1934 — *L'action de l'acide perchlorique sur les matières organiques et ses applications à la chimie analytique* — Actualités scientifiques et industrielles — 167 — Paris — Hermann & Cie.
- 28) — BLOOR, W. R. — 1914, 1915 — *Journ. of Biol. Chem.* 17, 377; 22, 133.