

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA GERAL, GENÉTICA ANIMAL E BROMATOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Milton de Souza Piza

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E BIOLÓGICA

Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

## SÔBRE OS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO INORGÂNICO NO SANGUE DE EQUINOS. APLICABILIDADE E ESTUDO COMPARATIVO (\*)

(ABOUT THE COLORIMETRIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS IN EQUINE BLOOD. APPLICABILITY AND COMPARATIVE STUDY).

FERNANDO ANDREASI  
Assistente

VIRGÍLIO BONOLDI  
Livre Docente

Com o intuito de verificar quais os teôres normais de fósforo inorgânico no sangue de equinos, deparamos desde logo com uma dificuldade séria, qual seja, a da escolha de um método prático e acessível.

Dada a difícil aplicabilidade dos métodos gravimétricos, precisos, porém pouco recomendáveis à prática diária, mercê da amostra exigida, propusemo-nos estudar os colorimétricos, largamente difundidos e preconizados para a determinação desse elemento no sôro de sangue humano.

Da leitura de alguns trabalhos orientados no sentido de estabelecer-se as taxas de fósforo e cálcio no sangue dos animais, deduz-se que os autores não se muniram da inicial precaução de verificar o método adotado, de cuja aplicabilidade não se pode confiar, senão depois de verificada experimentalmente.

Partindo deste ponto, dentre os diversos métodos colorimétricos que se têm à disposição para a dosagem desse elemento, no sangue humano, destacam-se os de Fiske-Subbarow<sup>(1)</sup>, Benedict-Theis<sup>(2)</sup>, Kuttner-Lichtestein e outros, os quais encerram apreciável simplicidade, a par de grande acessibilidade.

Recaiu a escolha, dentro dessa ordem de idéias, nos métodos de Fiske-Subbarow, Benedict-Theis e R. S. Pereira<sup>(3)</sup>.

### FUNDAMENTO QUÍMICO DOS MÉTODOS

O fósforo sob forma de ion fosfato — em quantidades superiores à 1-2 mg por 100 cm<sup>3</sup> — pode ser determinado de maneira prática e satisfatória por

(\*) Trabalho apresentado ao IV Congresso Brasileiro de Veterinária, realizado em janeiro de 1948, no Rio de Janeiro.

intermédio da formação de anion fosfomolibdico. A posterior redução e consequente formação de um fosfoconjugado de molibdeno  $[4(\text{MoO}_3)\text{MoO}_2]_2\text{PO}_4\text{H}_3$  — fosfoconjugado cerúleo-molibdico de Denigés — originará o aparecimento de cor azulada que se presta para fins colorimétricos ou fotométricos. Entre os diversos redutores apropriados, citam-se o ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, a hidroquinona e a benzidina.

Baseiam-se na utilização dos dois primeiros redutores citados, os métodos de Fiske-Subbarow e de Benedict e Theis; o método de R. S. Pereira fornece ao meio, já préformado, o grupamento molibdoso, constituindo pois uma variante operatória.

#### MÉTODO DE FISKE-SUBBAROW (1)

##### 1.1 — Ácido sulfúrico 10 N.

Dissolver em um béquer 278,5 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico p.a., D = 1,84, 15°C, em cerca de 500 cm<sup>3</sup> de água destilada; resfriar e transferir para matraz aferido de um litro. Completar o volume.

##### 1.2 — Molibdato I (molibdato de amônio à 2,5% em ácido sulfúrico 5 N).

Dissolver num béquer 12,5 g do sal, em cerca de 100 cm<sup>3</sup> de água destilada; transferir em seguida para frasco volumétrico de 500 cm<sup>3</sup>; adicionar 250 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 10 N. Completar o volume, após a lavagem do béquer.

##### 1.3 — Molibdato II (molibdato de amônio à 2,5% em ácido sulfúrico 3 N).

Proceder segundo acima referido para o molibdato I, com a particularidade de juntar 150 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 10 N.

##### 1.4 — Solução "Stock" de fosfato.

Dissolver em cerca de 100 cm<sup>3</sup> de água destilada, previamente seco em estufa (105-110°C) até peso constante, 0,351 g de fosfato mono-potássico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ), segundo Sørensen.

Transferir para um matraz de um litro.

Juntar 10 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 10 N e completar o volume.

5 cm<sup>3</sup> desta solução contém 0,4 mg de fósforo.

##### 1.5 — Solução padrão de fosfato.

Diluir à 100 cm<sup>3</sup> num frasco volumétrico, 10 cm<sup>3</sup> da solução "stock" acima.

##### 1.6 — Bissulfito de sódio a 15%.

Pesar aproximadamente 30 g de bissulfito de sódio p.a., e dissolver em cerca de 200 cm<sup>3</sup> de água destilada. Caso não se apresentar límpida, deixá-la em repouso pelo espaço de 2 à 3 dias antes de filtrar.

1.7 — Sulfito de sódio a 20%.

Pesar 200 g de sulfito de sódio ( $\text{SO}_3\text{Na}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p.a.) e dissolvê-las em cerca de 380  $\text{cm}^3$  de água destilada, filtrando se necessário. Guardar a solução em vidro de rólha esmerilhada.

1.8 — Ácido 1-amino--2-naftol-4-sulfônico, a 0,25%.

Dissolver 0,25 g do ácido em 97,5  $\text{cm}^3$  da solução de bissulfito de sódio a 15%, adicionando 2,5  $\text{cm}^3$  de sulfito de sódio a 20%. Agitar até completa solubilização. Protegida do contacto do ar, a solução conserva-se cerca de duas semanas.

1.9 — Ácido tricloroacético a 10%.

Dissolver 50 g do ácido puríssimo a 500  $\text{cm}^3$ , em água destilada.

*Análise*

- a) Transferir para pequeno Erlenmeyer (50  $\text{cm}^3$ ) 8  $\text{cm}^3$  de ácido tricloroacético a 10% e sob agitação constante, adicionar gotejando, 2  $\text{cm}^3$  de sôro.
- b) Filtrar, vertendo de uma só vez, em papel de filtro sêco e praticamente isento de cinzas.
- c) Pipetar 5  $\text{cm}^3$  do filtrado e transferi-los para frasco volumétrico de 10  $\text{cm}^3$  ou tubo graduado a 10  $\text{cm}^3$ .
- d) Colocar em outro frasco ou tubo, 5  $\text{cm}^3$  da solução padrão contendo 0,04 mg de fósforo (1.5).
- e) Acrescentar ao filtrado (c) 1  $\text{cm}^3$  de molibdato II (1.3) e ao padrão (d), 1  $\text{cm}^3$  de molibdato I (1.2). Agitar bem.
- f) Adicionar a ambos os tubos 0,4  $\text{cm}^3$  do ácido amino-naftol-sulfônico (1.8) e completar o volume com água destilada. Homogenizar perfeitamente e proceder à leitura no colorímetro, após 5 minutos.

*Cálculo*

Para ser calculado o teor de fósforo, de posse dos dados fornecidos pelo colorímetro e das quantidades utilizadas de sôro e filtrado, aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{mg de fósforo em } 100 \text{ cm}^3 \text{ de sôro} = \frac{100 \text{ Cc. Ac. V}}{\text{Ad. F. S}}$$

na qual

Cc = quantidade fósforo, em mg, existente no padrão;

Ac = altura em que ficou o prisma na solução padrão;

V = volume correspondente à sôma do ácido tricloroacético e sôro, pipetados na operação de desalbuminização;

Ad = médias das leituras obtidas por comparação com o padrão;

F = volume do filtrado utilizado para o desenvolvimento da côr;

S = sôro, em  $\text{cm}^3$ , tomado para desalbuminar.

*Notas:*

O ácido tricloroacético utilizado na desalbuminização do soro deve ser de alta pureza, a fim de não perturbar o desenvolvimento da cor. Além disso, recomenda-se fazer a pesquisa dos fosfatos. Esta procede-se da seguinte maneira:

Dispôr três béqueres de forma alta, de 150 cm<sup>3</sup> de capacidade, sobre fundo branco.

Em um deles (A), colocam-se 100 cm<sup>3</sup> de água. Noutro (B), juntam-se 85 cm<sup>3</sup> de água, 10 cm<sup>3</sup> de molibdato I e 4 cm<sup>3</sup> de ácido amino-naftol-sulfônico a 0,25%: deverá resultar uma solução praticamente incolor; caso contrário, uma ou outra das soluções adicionadas contém fosfato.

No terceiro béquer (C), adicionam-se 10 cm<sup>3</sup> de solução de ácido tricloroacético, 45 cm<sup>3</sup> de água, 10 cm<sup>3</sup> de molibdato II e 4 cm<sup>3</sup> da solução de ácido amino-naftol-sulfônico, agitando o conteúdo com auxílio de um bastão de vidro. Caso não se desenvolva nenhuma coloração, este fato comprova a boa qualidade do ácido tricloroacético utilizado na preparação da solução: caso contrário, toma-se o béquer (B), e junta-se 1 cm<sup>3</sup> da solução de fosfato contendo 0,005 mg por cm<sup>3</sup>, agitando cuidadosamente. Novas adições serão feitas, até que os conteúdos de ambos os béqueres apresentem a mesma coloração e isto a intervalos não menores a 2 minutos. O volume da solução de fosfato necessário para conseguir-se a finalidade citada, multiplicado por 0,05 dará a correção em mg por 100 cm<sup>3</sup>, isto é, a quantidade a ser subtraída do resultado da análise do sangue.

OBTENÇÃO DO ÁCIDO 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULFÔNICO, SEGUNDO  
FOLIN (5)

*Reagentes:*

Ácido sulfúrico n 10% .....	1000 cm <sup>3</sup>
Ácido clorídrico concentrado .....	500 cm <sup>3</sup>
Solução a 10% de hidróxido de sódio .....	300 cm <sup>3</sup>
Nitrito de sódio .....	50 g
Sulfito de sódio .....	50 g
Bissulfito de sódio .....	100 g
Naftol-beta ressublimado .....	100 g

*Preparação:*

a) Colocam-se 100 g de naftol-beta em um béquer de litro, acrescentam-se 300 cm<sup>3</sup> da solução a 10% de hidróxido de sódio e agita-se com um bastão até obter-se completa dissolução (de 10 a 15 minutos).

b) Colocam-se de 50 a 55 g de nitrito de sódio em um béquer de quatro litros; acrescentam-se 600 cm<sup>3</sup> de água e agita-se até a dissolução (de 3 a 5 minutos).

c) Verte-se a solução alcalina de naftol-beta em um béquer de quatro litros, com a solução de nitrito e lava-se com cerca de 100 cm<sup>3</sup> de água o primeiro béquer.

d) Acrescenta-se à mistura anterior 800 g de gelo.

e) Enche-se uma proveta de 200 cm<sup>3</sup> com solução fria de ácido sulfúrico a 10%, vertendo-se pouco a pouco pelas paredes do béquer, enquanto se agita com um bastão de vidro. Esta agitação deve prosseguir mais alguns minutos, após se haver adicionado todo o ácido sulfúrico.

Repete-se a adição do ácido sulfúrico nas condições acima referidas, usando cada vez 200 cm<sup>3</sup> até atingir o volume de 800 cm<sup>3</sup>.

A reação do meio não se apresentando francamente ácida, deve-se continuar a adição do ácido sulfúrico.

Ao juntar-se o ácido, começa a formar-se um precipitado amarelo, que aumenta gradualmente, até converter tóda a mistura em uma pasta semi-sólida.

O precipitado deve apresentar uma ligeira coloração esverdeada.

Deixar em repouso, durante uma hora, a fim de dissolver completamente o beta-naftol.

f) Filtrar em funil de Buchner de 20 cm de diâmetro, com sucção moderada, e lavar o filtro com 1500 cm<sup>3</sup> de água fria.

g) Colocar o precipitado beta-nitroso-naftol em uma cápsula grande, pulverizar sobre ela 100 g de bissulfito de sódio e 50 g de sulfito de sódio e agitar. Forma-se um composto de adição com o bissulfito de sódio e a mistura torna-se líquida. Filtrar imediatamente, em Buchner (de 12 a 15 cm de diâmetro), provido de papel de filtro duplo e de cinzas conhecidas; lavar em seguida, com um pouco de água destilada.

h) Verte-se o filtrado imediatamente (para evitar um excessivo escurecimento) em um béquer de cinco litros ou em frasco escuro de boca larga, com 2000 cm<sup>3</sup> de água e 500 cm<sup>3</sup> de ácido clorídrico concentrado. Colocar um funil munido de vidro de relógio, sobre a boca do béquer e deixar em repouso em lugar escuro, cerca de trinta e seis horas.

Decorrido este tempo, notam-se no frasco formações que têm o aspecto de agulhas brancas.

O aparecimento de cristais escuros ou rosados denota produtos de decomposição, devido à exposição prolongada à luz.

Filtrar em um Buchner nas condições acima e lavar com dois litros de água destilada.

#### PURIFICAÇÃO DO ACIDO 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULFÔNICO (6)

1) — Purificação pelo álcool: o produto final obtido, após lavagens sucessivas com água, é tratado com álcool em quantidades suficientes para descorar completamente os cristais.

2) — Purificação por cristalização: dissolver 150 g de bissulfito de sódio e 10 g de sulfito de sódio cristalizado em um litro de água destilada. Adicionar 15 g de ácido-amino-naftol,sulfônico bruto, recém-preparado e agitar. As impurezas que o acompanham não se solubilizam. A solução, depois de aquecida, é filtrada através de um papel de cerca de 32 cm<sup>2</sup>; resfriar o filtrado com água corrente e adicionar 10 cm<sup>3</sup> de ácido clorídrico concentrado. Filtrar com o auxílio da trompa; lavar com cerca de 300 cm<sup>3</sup> de água e, finalmente, com álcool, até o filtrado apresentar-se incolor. O produto obtido deve ser secado ao ar, sem exposição à luz; a seguir, depois de pulverizado, guarda-se em vidro escuro.

## MÉTODO DE BENEDICT-THEIS (2)

*Soluções reagentes:*

- 2.1 — Ácido sulfúrico ( $D = 1,84$  a  $15^{\circ}\text{C}$ ).
- 2.2 — Solução de molibdato de sódio, isento de amônio, a 8%. Dissolver 20 g de ácido molíbdico, isento de amônio, em 25  $\text{cm}^3$  de uma solução de hidróxido de sódio a 20%. Aquecer suavemente até dissolução completa. Resfriar e transferir para um frasco volumétrico de 250  $\text{cm}^3$ , completando o volume com água destilada. Filtrar se necessário.
- 2.3 — Solução de hidroquinona a 0,5% em bissulfito de sódio a 15%. Dissolver 15 g de bissulfito de sódio p.a., em cerca de 50  $\text{cm}^3$  de água destilada e acrescentar 0,5 g de hidroquinona p.a.; transferir para um matraz aferido de 100  $\text{cm}^3$ , completando-se o volume com água destilada.
- 2.4 — Solução "stock" de fosfato mono-potássico. Pesar, depois de seco em estufa ( $110-115^{\circ}\text{C}$ ), a peso constante 0,351 g de fosfato mono-potássico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ), segundo Sørensen. Dissolver em um pouco de água destilada; transferir para um frasco volumétrico de um litro, adicionando então 10  $\text{cm}^3$  de ácido sulfúrico 10 N. Diluir, finalmente, à marca.
- 2.5 — Solução padrão de fosfato mono-potássico. Pipetar 10  $\text{cm}^3$  da solução "stock" e diluir a 100  $\text{cm}^3$  com água destilada. 5  $\text{cm}^3$  desta solução encerram 0,04 mg de fósforo.
- 2.6 — Reagente molibdato-ácido sulfúrico. É constituído de um volume da solução de molibdato (2.2) para um volume igual de ácido sulfúrico,  $D = 1,84$  (2.1). Deve ser preparado no momento de usar.
- 2.7 — Ácido tricloroacético a 10%. Dissolver em água destilada, usando frasco volumétrico de 500  $\text{cm}^3$ , 50 g de ácido puríssimo.

*Análise:*

- a) A precipitação dos prótidos é obtida segundo técnica já descrita no método anterior, guardada a relação de um volume de soro para quatro de ácido tricloroacético a 10%.
- b) Procedida a filtração, segundo já preconizada, 4  $\text{cm}^3$  do filtrado são transportados para tubo marcado a 10  $\text{cm}^3$ , ou frasco volumétrico dessa capacidade.
- c) Em outro tubo ou frasco, colocar 5  $\text{cm}^3$  da solução padrão de fosfato (2.5).
- d) Em seguida, adicionar a ambos, 3  $\text{cm}^3$  de água destilada e 1  $\text{cm}^3$  do reagente molibdato-ácido sulfúrico (2.6). Agitar cuidadosamente.
- e) Acrescentar então 1  $\text{cm}^3$  da solução bissulfito-hidroquinona (1.3). Homogeneizar vigorosamente.

- f) Arrolhar, frouxamente, os tubos ou frascos, e mergulhá-los em água fervente, contida em um béquer, ai permanecendo durante 10 minutos.
- g) A seguir, resfriá-los em água corrente, completando-se finalmente o volume.
- h) Proceder à leitura colorimétrica.

*Cálculos:*

$$\text{mg de fósforo em } 100 \text{ cm}^3 \text{ de sôro} = \frac{100 \text{ Cc. Ac. V}}{\text{Ad. F. S.}}$$

na qual

Cc = quantidade de fósforo existente (em mg) no padrão;

Ac = altura do conhecido (solução padrão);

V = volume correspondente à sôma do ácido tricloroacético e sôro, pipetados na operação de desalbuminação;

Ad = altura do desconhecido (filtrado);

F = volume do filtrado utilizado para o desenvolvimento da côr;

S = sôro, em cm<sup>3</sup>, tomado para desalbuminar.

*Notas:*

Prolongando-se o aquecimento além de 10 minutos, produz-se ligeiro aumento na intensidade da côr; êsse fato, porém, não constitui inconveniente nas leituras colorimétricas, porque há proporcionabilidade em todos os tubos. A intensidade de côr obtida é muito pronunciada e estável.

#### MÉTODO FOTOMÉTRICO DE R. S. PEREIRA (3)

*Soluções:*

##### 3.1 — Ácido sulfúrico 10 N.

Medir 278,5 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico, D = 1,84 a 15°C e dissolvê-los em cerca de 500 cm<sup>3</sup> de água destilada. Após o resfriamento, proceder à transferência para matraz de um litro, completando-se o volume, depois da necessária lavagem do béquer usado na solubilização prévia.

*Reativo "A"*

##### 3.2 — Molibdato de amônio a 0,625% em ácido sulfúrico 5 N.

Dissolver em um béquer 6,25 g de molibdato de amônio (Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O), em cerca de 400 cm<sup>3</sup> de água destilada. Transferir para um frasco volumétrico de 1000 cm<sup>3</sup> e, após acrescentar 500 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico 10 N, completar o volume com água destilada.

**3.3 — Reativo "B"**

Colocar em frasco escuro, de rolha esmerilhada, 5 g de virutas de cobre não oxidado e 100 cm<sup>3</sup> da solução anteriormente preparada (3.2). Este reagente, agitado de quando em quando, estará pronto para ser utilizado, após três horas de contacto.

**3.4 — Ácido tricloroacético a 10%.**

Dissolver em água destilada 50 g de ácido puríssimo, usando frasco volumétrico de 500 cm<sup>3</sup>.

**3.5 — Mistura nitro-perclórica.**

Reunir na proporção de 3:1 ácido nítrico concentrado p.a., e ácido perclórico p.a.

**3.6 — Ácido sulfúrico N.**

Dissolver em um béquer 27,8 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico p.a., D = 1,84 a 15°C em cerca de 500 cm<sup>3</sup> de água destilada, resfriar e transferir para matraz aferido de um litro, completando-se o volume.

*Análise:*

- a) Transferir para pequeno Erlenmeyer (50 cm<sup>3</sup>), 4 cm<sup>3</sup> de ácido tricloroacético a 10% e sob agitação constante, adicionar, gotejando, 1 cm<sup>3</sup> de soro.
- b) Filtrar, vertendo de uma só vez, em papel de filtro seco e praticamente isento de cinzas.
- c) Pipetar 2 cm<sup>3</sup> do filtrado e transferi-los para tubo "Pyrex" graduado a 10 cm<sup>3</sup>.
- d) Juntar 2 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico N e aquecer em pequena chama, sob cuidadosa agitação, até redução a pequeno volume e ligeira carbonização.
- e) Colocar 1-2 gotas da mistura nitro-perclórica 3:1 e proceder à mineralização, na chama, sob constante agitação, até eliminação total dos vapores densos do ácido perclórico, além dos nitrosos.
- f) Diluir, após resfriamento, a cerca de 8 cm<sup>3</sup> com água destilada; juntar 0,8 cm<sup>3</sup> do reativo "A" (3.2) e 0,3 cm<sup>3</sup> do reativo "B" (3.3).
- g) Realizar um branco, usando tôdas as soluções e operando do mesmo modo.
- h) Levar os tubos — desconhecido e branco — frouxamente arrolhados à banho de água fervente, pelo espaço de 10 minutos.
- i) Após resfriamento espontâneo, ao ar, e haver completado o volume até a marca, efetuar a leitura no Pulfrich, utilizando o filtro S-72.

*Cálculo:*

Realizadas as leituras no Pulfrich, à direita e à esquerda, e tomadas as médias da transparência, calcula-se a quantidade de fósforo, pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{mg de P em } 100 \text{ cm}^3 \text{ de s\~{o}ro} = \frac{0.243 \cdot k \cdot V}{v}$$

na qual

$k$  = coeficiente da extinção;

$V$  = volume em que se desenvolve a c\~{o}r;

$v$  = s\~{o}ro, em  $\text{cm}^3$ , contido na alíquota tomada.

#### Notas:

Quando se concentrar a alíquota tomada, deve-se trabalhar cuidadosamente com chama pequena de bico de Bunsen, a fim de se evitarem projeções que, subtraindo fósforo, evidentemente, afetariam o resultado final.

A mistura nítro-perclórica que irá mineralizar o substrato requer cuidadosa eliminação dos vapores nitrosos que a princípio se formam, bem como os do ácido perclórico. Qualquer resíduo menor dos mesmos irá falsear os resultados, mercê da interferência exercida sobre o desenvolvimento de c\~{o}r.

O branco, que servirá como líquido de compensação na leitura fotométrica, não deverá ter senão muito fraca tonalidade azul; uma acentuação dessa c\~{o}r indica a necessidade de ser renovado o reagente descrito em 3.3.

O resfriamento espontâneo ao ar, após a permanência pelo espaço de 10 minutos em água fervente, é de suma importância: os resultados tendem a ser menores, se tal medida não for observada.

#### PARTE EXPERIMENTAL

Para podermos comparar os resultados obtidos pelos métodos acima descritos, partimos de uma mistura de s\~{o}ro proveniente de diversos animais, para assim disp\~{o}rmos de quantidade suficiente para realizar o objetivo em vista, quer quanto à aplicabilidade, quer quanto ao estudo comparativo.

O s\~{o}ro foi separado duas ou três horas após a sangria, contrariando assim as recomendações de PETER e VAN SLYKE (<sup>7</sup>). Segundo êsses autores há um processo de esterificação, que transforma o fósforo inorgânico em orgânico, decorridas duas ou três horas após a colheita, mesmo na ausência de hemólise. Ocorre também um processo inverso de hidrólise, com libertação do fósforo contido nas combinações orgânicas, aumentando-se dêsse modo a taxa de fósforo inorgânico.

Como visamos obter o maior volume possível de s\~{o}ro, não importando, por conseguinte, a riqueza e a origem do fósforo nêle existente, a separação foi feita sem obedecer às normas estabelecidas pelos citados autores.

Convém, entretanto, assinalar a importância que se deve dar à êste ponto, separando o s\~{o}ro, logo após a colheita, ou então, segundo as verificações de BUR-

KENS<sup>(8)</sup>, adicionar fluoreto de sódio, na proporção de 20 mg para um volume de 10 cm<sup>3</sup> de sangue. Este composto previne a transformação de fósforo orgânico em inorgânico ou vice-versa.

Estas considerações não impedem que se lembre e que se opere, quer na precipitação dos prótidos existentes no sôro, quer na filtragem, pela maneira como foi descrita em cada método, o que se fundamenta em razões que passamos à expôr: recomendações cabíveis, aliás, à todos os métodos que objetivem a determinação dos fosfatos inorgânicos do sangue.

O sôro — diz KOCH<sup>(9)</sup> — que terá seus prótidos removidos por precipitação no ácido tricloroacético à 10%, deverá ser gotejado no volume apropriado desse ácido, e não vice-versa. Tomar-se-á tal precaução, no sentido de prevenir a hidrólise dos ésteres do ácido fosfórico, a qual se processa rapidamente, devido à ação dos enzimas. Estes têm, entretanto, sua ação inibida, quando operarmos como foi indicado.

A obtenção do filtrado (do líquido) proveniente da precipitação dos prótidos no ácido tricloroacético, — refere ainda KOCH<sup>(9)</sup> — deve ser feita pela versão de uma só vez no funil filtrante, o que é importante para obviar a liberação do ácido fosfórico das combinações orgânicas.

Para os métodos de Fiske-Subbarow e Benedict-Theis utilizamos o colorímetro modelo Hellige e para o método de R. S. Pereira o fotômetro de Pulfrich.

#### MÉTODO DE FISKE-SUBBAROW

A fim de observar quais as variações que ocorrem em determinações repetidas no mesmo sôro, fizemos uma série de 12 tubos, tendo sido obtidos os resultados seguintes:

##### Dosagens procedidas no mesmo sôro

Tubos	mg de P por 100 cm <sup>3</sup> de sôro
1	3,66
2	3,66
2	3,66
4	3,62
5	3,73
6	3,77
7	3,71
8	3,68
9	3,61
10	3,60
11	3,72
12	3,69

A análise estatística (\*) desses resultados, revela o seguinte:

Média aritmética (V) .....	3,67 mg
Desvio padrão ( $\sigma \pm$ ) .....	0,049 mg
Coefficiente de variabilidade (C.V.) .....	1,33 %

Como se depreende, o coeficiente de variabilidade, bastante baixo, indica a constância dos resultados verificados.

#### PROVA DE RECUPERAÇÃO

Visando conhecer a capacidade de recuperação do método, fizemos outra série de tubos, adicionando ao filtrado do sôro, quantidades conhecidas de fósforo. Como se nota no quadro seguinte, foram acrescentadas à volumes fixos do filtrado, quantidades variáveis de uma solução de fosfato.

Eis os resultados:

Tubos	P (mg) por cm <sup>3</sup> de sôro	P (mg) adicionado por cm <sup>3</sup>	mg de P (teórico) em 100 cm <sup>3</sup>	mg de P (encontrado) em 100 cm <sup>3</sup>	Porcentagem de recuperação
1	0,0367	0,0207	2,87	2,87	100,00
2	0,0367	0,0207	2,87	2,85	99,30
3	0,0367	0,0207	2,87	2,83	98,60
4	0,0367	0,0248	3,07	3,11	101,30
5	0,0367	0,0248	3,07	3,08	100,32
6	0,0367	0,0248	3,07	3,09	100,65
7	0,0367	0,0290	3,28	3,27	99,69
8	0,0367	0,0290	3,28	3,25	99,08
9	0,0367	0,0290	3,28	3,23	98,47
10	0,0367	0,0331	3,49	3,51	100,57
11	0,0367	0,0331	3,49	3,44	98,56
12	0,0367	0,0331	3,49	3,43	98,28

O teste T aplicado à recuperação, dá-nos os seguintes resultados:

$$\bar{X} = 0,01416$$

$$\frac{S}{12} = 0,0091108$$

$$T = 1,50$$

Os valores de T nos níveis de 5%, 2% e 1% são respectivamente, 2,2; 2,72 e 3,11; o que, em face do resultado encontrado — 1,50 — nos leva a afirmar que a diferença entre X e o seu valor ideal (0) é atribuível ao acaso.

(\*) Consignamos aqui os nossos agradecimentos ao Prof. Pedro Egydio de Carvalho, pela orientação segura imprimida à interpretação estatística do presente trabalho.

## MÉTODOS DE BENEDICT-THEIS \*

Ao acompanharmos a descrição do método, verificamos que os autores não fazem referência alguma acerca da necessidade ou não de adicionar ao padrão o ácido tricloroacético.

Com tal objetivo, em uma série de determinações, foram empregados dois padrões, tendo sido colocado em um dêstes um volume de ácido tricloroacético equivalente ao existente no filtrado de sôro.

Os valores registrados figuram abaixo:

Tubos	mg de fósforo em 100 cm <sup>3</sup> de sôro	
	Padrão com ácido tricloroacético	Padrão sem ácido tricloroacético
1	3,78	3,75
2	3,71	3,68
3	3,63	3,68
4	3,67	3,62
5	3,61	3,57
6	3,61	3,53
7	3,71	3,70
8	3,61	3,62
9	3,69	3,70
10	3,76	3,70
11	3,69	3,61
12	3,59	3,51

## Resultados estatísticos

	Padrão	
	com ácido tricloroacético	sem ácido tricloroacético
Média aritmética ( $\bar{V}$ ) .....	3,67 mg	3,69 mg
Desvio padrão ( $\sigma_{\pm}$ ) .....	0,059 mg	0,087 mg
Coefficiente de variabilidade (C.V) ..	1,60 %	2,35 %

(\*) Em trabalho anterior (10), aplicando o presente método ao eletro-fotômetro de Fisher, obtivemos resultados semelhantes aos aqui consignados.

Calculando-se o valor do teste T, teremos:

	teórico	encontrado
Valor t ao nível 1% .....	3,11	0,66 não significante

Ora, o valor t ao nível de 1%, sendo 3,11 então a diferença por nós encontrada, póde ser imputada ao acaso, o que, em outras palavras, significa que os nossos dados não nos autorizam a concluir ser indispensável a adição do ácido tricloroacético para compensação da acidês do padrão.

Prosseguindo-se daí e conduzindo-nos dentro do mesmo critério observado no método anterior, fizemos uma série de 12 determinações no mesmo sôro, com o intuito de verificar as oscilações possíveis. Nestas dosagens, empregamos apenas 4 cm<sup>3</sup> do filtrado, equivalendo a 0,8 cm<sup>3</sup> do sôro e 3 cm<sup>3</sup> da solução padrão (5 cm<sup>3</sup> = 0,03884 mg).

Eis os resultados:

**Dosagens feitas no mesmo sôro**

Tubos	mg de P por 100 cm <sup>3</sup> de sôro
1	3,66
2	3,65
3	3,71
4	3,69
5	3,66
6	3,67
7	3,70
8	3,63
9	3,70
10	3,56
11	3,74
12	3,65

A análise estatística dos resultados encontrados mostra o seguinte:

Média aritmética ( $\bar{V}$ ) .....	3,67 mg
Desvio padrão ( $\sigma \pm$ ) .....	0,044 mg
Coefficiente de variabilidade (C.V.) .....	1,20 %

## PROVA DE RECUPERAÇÃO

Seguindo as mesmas normas observadas no método anterior (Fiske-Subbarow), quantidades diferentes de fósforo adicionaram-se à valores constantes de sêro, figurando os resultados obtidos pela análise no quadro seguinte:

Tubos	P no sêro por cm <sup>3</sup> (mg)	P adicionado por cm <sup>3</sup> (mg)	mg de P (teórico) em 100 cm <sup>3</sup>	mg de P (encontrado) em 100 cm <sup>3</sup>	Porcentagem de recuperação
1	0,0367	0,0207	2,87	2,88	100,34
2	0,0367	0,0207	2,87	2,83	98,60
3	0,0367	0,0207	2,87	2,86	99,65
4	0,0367	0,0248	3,07	3,10	100,97
5	0,0367	0,0248	3,07	3,15	102,60
6	0,0367	0,0248	3,07	3,20	104,23
7	0,0367	0,0290	3,28	3,40	103,65
8	0,0367	0,0290	3,28	3,37	102,74
9	0,0367	0,0290	3,28	3,35	102,13
10	0,0367	0,0331	3,49	3,54	101,43
11	0,0367	0,0331	3,49	3,51	100,57
12	0,0367	0,0331	3,49	3,54	101,43

Os valores numéricos limites de  $t$ , a quaisquer dos níveis de 1%, 2% e 5%, sendo menores do que o encontrado -- 3,38 -- e  $X$  sendo negativo ( - 0,05) isto nos sugere então a hipótese que o método, ao dosar os fosfatos, o faz de tal maneira que implica no aparecimento de um resultado que se afasta da quantidade real de fosfato existente na amostra.

Além disto, procuramos conhecer as variações de fósforo, em função do tempo decorrido após o desenvolvimento da côr, considerando que os autores e outros, nêsse particular, dão liberdade ao analista, para conduziram-na ao proprio arbítrio.

Para isso, realizamos mais 12 determinações e, após o desenvolvimento da côr, registramos as leituras do colorímetro, observando intervalos de tempo constantes no quadro que se segue.

Tubos	mg de P em 100 cm <sup>3</sup> de sôro		
	tempo decorrido após o desenvolvimento da côr		
	A.	B	C
	logo após	6 horas	23 horas
1	3,64	3,56	3,64
2	3,67	3,71	3,87
3	3,69	3,60	3,70
4	3,67	3,68	3,72
5	3,64	3,65	3,73
6	3,64	3,65	3,65
7	3,63	3,64	3,70
8	3,59	3,63	3,58
9	3,63	3,68	3,65
10	3,64	3,69	3,66
11	3,65	3,76	3,65
12	3,56	3,64	3,60

A análise estatística d'esses resultados, manifesta o seguinte:

	logo após	6 horas	23 horas
Média aritmética ( $\bar{V}$ ) .....	3,63 mg	3,65 mg	3,67 mg
Desvio padrão ( $\sigma \pm$ ) .....	0,0352 mg	0,0502 mg	0,0725 mg
Coefficiente de variabilidade (C.V.) ..	0,96 %	1,37 %	1,97 %

Tendo-se à disposição os dados acima e calculando-se os valores do teste t, resulta:

A com B	A com C	B com C
1,14%	1,72%	0,79%
Não significante	Não significante	Não significante

Como vemos, os nossos dados não bastam para se poder afirmar que o tempo de leitura tenha importância, visto que, diferenças como as observadas podem ser imputáveis ao acaso, dentro do critério supracitado.

Se as diferenças observadas pudessem ser consideradas significantes, o aumento na média poderia ser atribuível ao padrão que, submetido à luz artificial do colorímetro, por mais tempo, provavelmente estaria sujeito à uma descoloração maior, em relação aos outros.

#### METODO FOTOMETRICO DE R. S. PEREIRA (3)

Para o método, trabalhando em amostras do mesmo sôro, obtivemos os resultados que abaixo vêm tabelados.

Tubos	mg de P em 100 cm <sup>3</sup> de sôro
1	3,72
2	3,94
3	3,80
4	4,24
5	3,73
6	3,71
7	3,63
8	3,57
9	3,83
10	3,71

Da interpretação estatística, resulta:

Média aritmética (V) .....	3,78 mg
Desvio padrão ( $\sigma \pm$ ) .....	0,179 mg
Coefficiente de variabilidade (C.V.) .....	4,73 %

#### PROVA DE RECUPERAÇÃO

Quanto à recuperação, os resultados podem ser abaixo vistos:

Tubos	P no sôro por cm <sup>3</sup> (mg)	P adicionado por cm <sup>3</sup> (mg)	mg de P (teórico) em 100 cm <sup>3</sup>	mg de P (encontrado) em 100 cm <sup>3</sup>	Porcentagem de recuperação
1	0,0378	0,0082	2,30	2,33	101,30
2	0,0378	0,0082	2,30	1,97	85,65
3	0,0378	0,0082	2,30	2,17	94,34
4	0,0378	0,0165	2,71	2,60	95,76
5	0,0378	0,0165	2,71	2,60	95,76
6	0,0378	0,0165	2,71	2,71	100,00
7	0,0378	0,0207	2,92	2,56	87,52
8	0,0378	0,0207	2,92	2,66	90,94
9	0,0378	0,0207	2,92	2,79	95,38
10	0,0378	0,0248	3,13	3,32	106,07
11	0,0378	0,0248	3,13	3,17	101,27
12	0,0378	0,0248	3,13	2,88	92,01

O teste T, aplicado à recuperação, dá-nos como resultado 2,49, maior do que o valor teórico ao nível de 5% (2,20), as diferenças observadas não podendo por êste critério ser atribuídas ao acaso. Vale, entretanto, notar que o valor 2,49 é inferior aos de níveis 2% e 1% (2,72 e 3,11, respectivamente), o que até certo ponto, nos leva a ter cautelas na afirmação da significância da diferença.

## DISCUSSAO

Coligidos os dados anteriores, temos:

	Fiske-Subbarow	Benedict-Theis	R. S. Pereira
M (média) .....	3,67 mg	3,67 mg	3,78 mg
Desvio padrão ( $\sigma \pm$ ) ...	0,049 mg	0,044 mg	0,179 mg
C.V. (porcentagem de variabilidade) .....	1,33 %	1,20 %	4,73 %
N (número de determinações) .....	12	12	12

O cálculo do teste T, aplicado à recuperação, forneceu os seguintes resultados:

	Fiske-Subbarow	Benedict-Theis	R. S. Pereira
$\bar{X}$	0,01416	-0,05	0,1183
$\frac{S}{N}$	0,0094108	0,0147657	0,0474472
Valor de T	1,50	-3,38	2,49
Significância	Não significativa	Significante	Significante ao nível 5%

O teste F, entre os três métodos, dá-nos os seguintes resultados:

Fonte das variações	Variações ou soma dos quadrados dos desvios	Gráus de liberdade	Variance	Valor de F (calculado)
Inter-determinações	0,3745	31	0,01208	4,03
Entre-determinações	0,0954	2	0,0487	significante

Este resultado, desde que o valor F ao nível da distribuição de 5% com  $n = 2$  e  $n_2 = 31$ , é de aproximadamente — 3,316 —, diz-nos que os métodos têm variações que pelo critério supra não podem ser atribuídas ao acaso e sim decorrem de fatos que podem ou poderiam ser atribuíveis à falhas inerentes aos métodos.

Como o coeficiente de variabilidade era favorável, especialmente no que concerne aos dois primeiros dos supracitados métodos, resolvemos aplicar o teste de variação aos métodos, tomados dois a dois. Eis o resumo dos cálculos a que essa prática nos levou:

Método	Fonte das variações	Sôma dos quadradinhos dos desvios	Grãos de liberdade	Variance	Valor de F calculado	Valor de F ao nível da distribuição de 5%
Fiske-Subbarow e Benedict-Theis	Intra-determinações	0,0524584	22	0,00238447	0,141	4,301
	Entre-determinações	0,0003375	1	0,0003375	Não significativo	
Fiske-Subbarow e R. S. Pereira	Intra-determinações	0,03511	20	0,01755	3,908	4,351
	Entre-determinações	0,0686	1	0,0686	Não significativo	
Benedict-Theis e R. S. Pereira	Intra-determinações	0,3454	20	0,01727	4,522	4,351
	Entre-determinações	0,0781	1	0,0781	Significante	

Os resultados supra mostram claramente que, enquanto a diferença de variabilidade entre Fiske-Subbarow e Benedict-Theis é atribuível ao acaso, o mesmo não acontece em relação à Benedict-Theis e R. S. Pereira, em que a diferença é significativa. Este último resultado, aliado à diminuta diferença entre F observado e o F teórico no caso de Fiske-Subbarow e R. S. Pereira, nos sugere que a diferença de variabilidade notada entre os três métodos deve principalmente correr por conta da discrepância entre o coeficiente de variabilidade do método de R. S. Pereira e dos outros dois.

## CONCLUSÕES

Conclui-se, em face dos resultados da experimentação e dentro dos limites em que a mesma foi feita, e pelo que a interpretação estatística dos resultados nos forneceu, ser evidente que o método de Fiske-Subbarow merece preferência aos outros como consequência de maior fidedignidade dos resultados. Quanto aos métodos de Benedict-Theis e R. S. Pereira, a preferência não é dada em razão — o primeiro — por ter a sua recuperação e portanto as dosagens, como o comprova o teste T, afastadas do teor a ser encontrado; — o segundo — se bem que somente tendo o teste T significativo ao nível de 5%, por ter uma percentagem de variabilidade acentuada relativamente aos outros — 4,73% — como aliás o evidencia o teste F. Assim, pois, preconiza-se na determinação dos fosfatos inorgânicos no sêro de eqüinos, o método de Fiske-Subbarow.

## RESUMO

Os autores examinaram a aplicabilidade dos métodos de Fiske-Subbarow, Benedict-Theis e R. S. Pereira à determinação do fósforo inorgânico no sangue de eqüinos. Trabalhando com uma única mistura de sêro, realizaram com cada qual dos citados métodos uma série de determinações, a fim de observar quais as variações atinentes à cada um dêles. Visando, depois, conhecer a capacidade de recuperação dos métodos, acrescentaram ao sêro quantidades conhecidas de fósforo, procedendo depois às respectivas determinações. Aplicando aos dados obtidos a análise estatística (teste T e teste F), concluem os autores que, face aos dados e nas condições da experimentação, merece preferência, pela maior fidedignidade dos resultados, o método de Fiske-Subbarow. Encontraram no método de Benedict-Theis a recuperação, significativamente afastada do valor teórico, o que evidencia o teste T. O método de R. S. Pereira, cuja variabilidade é relativamente aos outros, acentuada, tem, — confrontados dois à dois os métodos quanto aos valores da distribuição (teste F) — os resultados significativamente afastados do limite máximo da probabilidade, ao nível de 5%.

## ABSTRACT

*The AA. examined the applicability of Fiske-Subbarow, Benedict-Theis and R. S. Pereira methods to the determination of inorganic phosphates in horse blood. Using one single sample of serum, they made a series of determinations, according to those methods, in order to observe the variations relative to each one.*

*After this the recovery capacity of the methods was studied by adding to the serum, known amounts of phosphorus, before respective determinations were made. Statistical analyses of the data obtained (T-test and F-test), suggests that, under the experimental conditions, the Fiske-Subbarow method has to be chosen*

*because it offers results of reliability. The recovery in the Benedict-Theis method was found of statistical significance in view of the theoretic values to be expected (T-test).*

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — FISKE, C. H. e SUBBAROW, Y. — 1925 — The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**:375-80
- 2 — BENEDICT, S. R. e THEIS, R. C. — 1924 — A modification of molybdic method for the determination of inorganic phosphorus in serum. *J. Biol. Chem.* **61**:63-70.
- 3 — PEREIRA, R. S. — 1939 — Determinação espectrofotométrica do ácido fosfórico por meio da reação cerúleo-molibdica de Denigès. *Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo*, **1** (2):153-69.
- 4 — KUTTENER "in" LESER-GERMECK — Notas sobre o método de Kuttener Lichtestein-Bodansky, para a determinação do fósforo inorgânico no sangue. *An. Fac. Med. São Paulo*, **12**(1):337-53, 1936.
- 5 — FOLIN, O. — 1930 — *Manual Práctico de Análises Biológicas*. Barcelona. José Montesó. 1.ª edição: 277-81.
- 6 — YOE, J. H. — 1928 — *Photometric Chemical Analysis*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1:349-50.
- 7 — PETERS, J. P. e VAN SLYKE, D. D. — 1932 — *Quantitative clinical chemistry*. The Williams & Wilkins Co., 2.
- 8 — BURKENS, J. C. J. — 1935 — The use of sodium fluoride as a blood anticoagulant in blood phosphorus determinations. *Bioch. J.* **29**:796-801.
- 9 — KOCH, F. C. — 1941 — *Practical Methods in Biochemistry*. 3rd.: 162-3. Baltimore, Williams & Wilkins Company.
- 10 — BONOLDI, V. e ANDREASI, F. — 1948 — Notas sobre o emprego do método de Benedict-Theis na determinação do fósforo inorgânico no sangue dos equinos, pelo Electro-Fotômetro de Fisher. *Rev. Fac. Med. Vet. de São Paulo*, **3**(4):181-6.