

Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia
Diretor: Prof. Dr. Z. Vaz

SOBRE A DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO NOS PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

POR

Rubens Salomé Pereira

Livre Docente da Universidade de São Paulo
Comissionado na Fac. Medicina Veterinária

Nos cereais, e em outros produtos de origem vegetal, larga percentagem do fósforo total se acha sob forma de fitina, sal de *Ca* e *Mg* do ácido inositolhexafosfórico, composto que tem sido muito recomendado como tônico devido à crença de ser facilmente assimilável o *P* nele contido. Já em 1913, porém, PLIMMER (1) achava que as enzimas intestinais não libertavam o *P* dos fitatos. Trabalhos recentes, confirmando esse modo de ver, demonstram ser muito reduzida a assimilação do *P* fítico. Em 1926, E. MELLAMBY (2) chamava a atenção dos estudiosos para o fato de o excesso de cereais e a falta de vitaminas liposolúveis na dieta serem fatores capazes de predispor as crianças ao raquitismo e à cárie dentária. Em 1928, GREEN e MELLAMBY (3), estudando a ação anticalcificante dos cereais, demonstraram a possibilidade de intensificar-se o raquitismo, mantendo-se constantes os demais fatores, pelo aumento da quantidade desses alimentos na ração; mostraram que entre estes há notáveis diferenças em quanto se refere ao efeito raquitogênico; que a vitamina *D* exerce ação contrária à deles, e que a adição de *Ca* à dieta, sob forma de CO_3Ca , de $(PO_4)_2Ca_3$, diminui os maus efeitos observados. Esses mesmos autores verificaram, ainda, que a fervura em meio clorídrico anulava o poder anticalcificante assinalado. Anteriormente, em 1926, E. MELLAMBY (4) havia notado que a farinha de aveia, se bem que relativamente rica de *Ca* e de *P*, prejudicava a calcificação do esqueleto, no caso de dietas pobres de vitamina *A*, e, acreditando que esse fato se devesse a um "fator anticalcificante" a que deu o nome de *toxiamina*, verificou que esta se destruía pela fervura em *ClH* a 1%, assim como pela germinação e subsequente aquecimento a 100° durante 18 horas. Em 1934, porém, BRUCE e CALLOW (5), usando nas suas experiências dietas ricas de *Ca* e pobres de *P* administradas a ratos, verificaram que excesso de inositolhexafosfatos prejudicava a absorção do *Ca*, e dos estudos feitos concluíram que a ação raquitogênica dos cereais se deve ao fato de o *P* fítico não ser assimilável. LECOQ e BARBAN (6), em 1935, mostraram que os ésteres aromáticos do ácido fosfórico não exercem ação antir-

raquitógena, e acharam que o *P* dos fitatos não era assimilável. MAC CANCE e WIDDOWSON (7) verificaram que parte variável, e sempre muito grande, da fitina ingerida se eliminava inalterada, e acharam que o fato de não se encontrar nas fezes todo o ácido fítico administrado não constitui prova segura de haver sido ele assimilado pelo organismo, visto existir a possibilidade de a fitina hidrolisar-se pela flora intestinal em nível inferior ao em que se dá a absorção, pois o *P* total das fezes analisadas era muito superior ao *P* dos fitatos ingeridos. LOWE e STEENBOCK (8) mostraram que o milho, se bem que anticálcico, adquire propriedades antirraquitógenas após haver sido tratado pelo *ClH*, o que se deve, certamente, à hidrólise do ácido fítico e à consequente libertação do *P* mineral assimilável. Sabe-se que as rações ricas de *Ca*, de *P*, de vitaminas *C* e *D*, capazes de promover a calcificação normal do esqueleto e de manter o animal em bom estado alimentar, são geralmente as mais eficientes no que se refere à cárie dentária. Entre nós, cabe a FONSECA RIBEIRO (9) o mérito de haver discutido esse assunto e de para ele ter chamado a atenção dos estudiosos e dos poderes públicos.

A importância da fitina, porém, não se resume ao aspecto da função de fornecedora de *P* ao organismo. Em 1928, EASTCOTT (10) verificou ser o inositol, o bios I. Recentemente, WOOLLEY (11) (12) descobriu novo fator essencial ao desenvolvimento do rato e identificou-o com a inosita. WOOLLEY observou que as rações desprovidas desse fator determinavam a cessação do crescimento do camundongo e o aparecimento de grandes zonas de alopecia. Os animais que apresentavam esses sintomas, curavam-se pela adição de inositol, ou de fitina, à dieta, e também pela administração de concentrados de fígado. Nessas condições, ainda que o ácido fítico se inclua entre os compostos estáveis do *P*, e que seja escassamente hidrolisado no organismo, é ele capaz de fornecer em quantidade suficiente o inositol necessário ao desenvolvimento normal dos seres.

O assunto de que ora nos ocupamos, apresenta importância particularmente grande nas regiões em que os produtos de origem vegetal, os cereais principalmente, constituem a base da alimentação do povo. Em tais zonas, o cálculo da quantidade de *P* útil das rações baseado no *P* total nelas achado, é orientação que pode ser inteiramente falha.

Grandes áreas do nosso país dão forragens de baixo teor em ácido fosfórico, e como consequência disso ocorre permanente deficiência de *P* posto à disposição dos animais, o que se reflete também

na nutrição dos habitantes de tais regiões. A produção forrageira, nas condições naturais, é, por via de regra, baixa por unidade de superfície, e o valor nutritivo das forragens, deficiente sob vários aspectos. Como os animais domésticos recebem normalmente dos cereais a maior parte do *P* alimentar, o problema da assimilação do *P* fítico assume particular importância e nessas condições, levando-se em conta o fato de os cereais serem abundantemente consumidos entre nós, evidencia-se o interesse que apresentam os estudos relativos não só à quantidade total do *P* existente nos alimentos, como também à forma sob que esse elemento neles se acha.

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO

Os métodos propostos para a dosagem do ácido fítico se baseiam, em geral, na precipitação do mesmo pelo *Fe* (7), (13), (14) e (15). HEUBNER e STADLER titulam o ácido inositolhexafosfórico, em meio clorídrico, pelo $Cl_3 Fe$ em presença do $C N_3 S N H_4$. As desvantagens de tal processo, particularmente no caso de pequenas quantidades do composto em extratos coloridos, são óbvias. Afim de evitar os precalços dessa técnica, YOUNG propôs flocular-se pelo calor o fitado de ferro formado em meio de *ClH* n/6 e em presença de quantidade medida da solução titulada de $Cl_3 Fe$ e, após separar-se o precipitado obtido, determinar-se colorimetricamente o excesso de *Fe* pelo método do tiocianato.

MAC CANCE e WIDDOWSON preferem isolar e lavar o sal férrico, transformá-lo em fitado de sódio, e determinar o *P* fítico, após incineração sulfo-perclórica, pelo método de BRIGGS. COMMON (16) usa o processo descrito por MAC CANCE e WIDDOWSON, mas prefere determinar o *P* fítico pelo método de FISKE e SUBBARROW, o que o força a abandonar a incineração sulfo-perclórica e a incinerar o fitato de sódio por via seca, em presença de acetato de cálcio. LEVA e RAPORT (17), achando que no caso do sangue esses processos não dão resultados satisfatórios, introduzem certas modificações no método de MICHEL-DURAND (18) e aplicam-no à dosagem do ácido fítico no referido líquido. O *P* do fitado de cálcio isolado, determina-se pelo método de FISKE e SUBBARROW. WOOLLEY (19), preocupando-se com a determinação do inositol no fígado e julgando que, pelo menos nesse caso, a recuperação era insatisfatória quando se empregavam os processos citados, baseou-se no citado trabalho de EASTCOTT e propôs método biológico para a dosagem da inosita em produtos naturais.

A técnica de determinação do ácido fítico por meio do isolamento do sal férrico, é relativamente cômoda, rápida e a reação é sensível; como, porém, a precipitação desse sal, no caso de extratos de origem biológica, se faz em meio em que se encontram fosfatos minerais e compostos orgânicos do *P*, há sempre perigo de adsorção. Como o notam LEVA e RAPOPORT, o precipitado de fitato de ferro sempre se contamina pelos fosfatos minerais e orgânicos, e os resultados obtidos por esses pesquisadores, nas tentativas feitas para evitar esse grave inconveniente, não foram animadores.

À vista do interesse que esse assunto apresenta para nós, julgamos de bom aviso estudar a questão. Os resultados que em seguida se expõem, mostram que, com as modificações que adiante se descrevem, o método do fitato de ferro é perfeitamente seguro, pelo menos no estudo de produtos de origem vegetal, que foram os usados no presente trabalho.

PROCESSO

- Reativos necessários:*
- a) $NaOH$ 5 n, n/2, n/10
 - b) ClH n/2, n/6 e n/10.
 - c) Cl_3Fe . Solução de Cl_3Fe em ClH n, em que há 0,5 mgr. de Fe per cm^3 .
 - d) Solução alcoólica de fenolftaleína a 1%.

A solução de ácido fítico em ClH n/2 é exatamente medida e posta em tubo de centrifugação de 100 x 12 mms., graduado à altura de 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 3,5 4 e 5 cm^3 . Ajunta-se traço de (d), alcaliniza-se levemente pelo $NaOH$ 5 n, destroi-se em seguida a cor por meio do ClH n posto às gotas e em quantidade justamente suficiente, adiciona-se água destilada até perfazer-se volume marcado na parede do tubo e imediatamente superior ao conseguido após a adição do ClH n. Ajunta-se, após, (c) na proporção de 0,2 cm^3 per cm^3 do líquido no tubo, e este se mergulha em banho-maria fervente durante 10 minutos, afim de floccular-se o fitato de ferro. Esfria-se em água corrente o tubo, centrifuga-se à velocidade de 2.500 - 3.000 rotações p.m., durante 10 minutos, e decanta-se o líquido sobrenadante. Suspende-se, em seguida, o precipitado em tantos cm^3 de ClH n/6 quantos tenham sido os cm^3 da solução fítica tomados para a análise, centrifuga-se e decanta-se como anteriormente. Repetem-se as operações de lavagem. Ao precipitado assim conseguido ajunta-se volume de $NaOH$ n/2 igual à metade do número de cm^3 da solução fítica tomado para a determinação. Agita-se, e eventualmente aquece-se em banho-maria, até dissolução completa. Adicionam-se, em seguida, tantos cm^3 de ClH n/2

quantos sejam necessários para neutralizar-se a solução e, logo após, tantas vezes 0.2 cm³ de (c) quantos sejam os cm³ do volume obtido pela neutralização pelo *ClH* n/2. Leva-se o tubo ao banho-maria fervente, durante 10 minutos, afim de flocular-se o fitato de ferro. Resfria-se aquele em água corrente, centrifuga-se, decanta-se o líquido e lava-se o precipitado duas vezes, como anteriormente. Ao tubo em que se acha o corpo assim lavado, ajuntam-se 2 cm³ de *NaOH* n/10; mergulha-se o mesmo em banho-maria fervente: o fitato de ferro se dissolve, forma-se o fitato de sódio e o hidróxido de ferro se precipita. Esfria-se o tubo em água corrente, centrifuga-se energicamente, e passa-se a solução do sal fítico para um tubo de experiências de vidro Pirex, de 200 x 20 mms., graduado à altura de 10 cm³ em que já se acha 1 cm³ de *SO₄H₂* 2 n. Dissolve-se o hidróxido de ferro em 1 cm³ de *ClH* n/10 e reprecipita-se, em banho-maria fervente, por 2 cm³ de *NaOH* n/10. Centrifuga-se como anteriormente e passa-se o líquido de lavagem para o referido Pirex. A solução neste contida evapora-se até pequeno volume, e incinera-se por via úmida, segundo a técnica indicada por SALOMÉ PEREIRA (20). A solução sulfúrica obtida dilue-se em 3-4 cm³ de água destilada, alcaliniza-se, em presença de fenolftaleína, pelo *NaOH* n, e em seguida acidifica-se levemente por algumas gotas de *SO₄H₂* n. Perfaz-se exatamente o volume de 10 cm³, com água destilada, e tomam-se aliquotas convenientes para a determinação fotométrica do ácido fosfórico, pelo método de SALOMÉ PEREIRA (21).

PRECIPITAÇÃO DO FITATO DE FERRO — YOUNG mostrou que uma solução de 2,5 mgr. de *Fe* em 5 cm³ de *ClH* n era suficiente para precipitar até 2 mgr. de ácido fítico, expresso em *P*, diluído em 25 cm³ de solvente. Nessas condições obtém-se solução clorídrica de título n/6, que é a escolhida por YOUNG, e também por MAC CANCE e WIDDOWSON, para a precipitação do fitato de ferro. Os últimos investigadores citados verificaram que esse sal se precipitava quantitativamente em todos os meios de acidez clorídrica compreendida entre “fracamente ácida” e a correspondente à de *ClH* n/6. YOUNG, usando 25 cm³ de solução fítica neutra, ou levemente ácida, e 5 cm³ de solução clorídrica de *Fe*, observou que, no caso de 0.2 mgr. de *P* fítico, precipitação nítida não se processava em menos de 15 minutos de aquecimento em banho-maria fervente. Trabalhando com volume total de 24 cm³, MAC CANCE e WIDDOWSON aconselham o mesmo espaço de tempo. Os volumes totais — de 1 a 6 cm³ — com que lidamos permitem obter-se precipitação nítida muito mais rapidamente, como o demonstra o quadro seguinte:

Solução fítica tomada para a análise cm ³	Volume em que se efetuou a floculação cm ³	Tempo de imersão em banho-maria minutos	P fítico em 100 cm ³ da solução original mgr.
0.5	1.2	5	4.76
1.0	1.8	6	4.78
1.5	2.0	7	4.74
2.0	2.5	5	4.74
3.0	4.0	7	4.80
4.0	6.0	8	4.74
0.5	1.2	10	4.78
4.0	6.0	10	4.80
4.0	6.0	15	4.78
4.0	6.0	20	4.78
4.0	6.0	30	4.70

À vista desses números, prolongamos o aquecimento por 10 minutos.

A variação dos volumes finais nenhuma influência exerce nos resultados, como se vê. Aquecimento muito longo — duas, tres horas — parece determinar certa hidrólise, mas os números obtidos pela imersão em banho-maria fervente durante 20 minutos, são perfeitamente satisfatórios. Isso era, aliás, de esperar-se, pois o ácido inositolhexafosfórico é dificilmente hidrolisavel.

A precipitação de pequenas quantidades de ácido fítico se realiza com certa dificuldade em volumes relativamente grandes, de solução. YOUNG o nota no caso de 0,2 mgr. P fítico em 30 cm³ de líquido. Fato semelhante nós o verificamos quando 0.02 mgr. de P fítico se encontravam diluidos em 6 cm³. Entretanto, quantidade de fitina correspondente a 0,01 mgr. de P facilmente floculava quando o volume final se elevava a 1 cm³. Partindo-se dessas observações, conclue-se que o volume da solução a analisar deve ser diretamente proporcional à quantidade de ácido fítico a dosar.

INFLUÊNCIA DA LAVAGEM: Na técnica de MAC CANCE e WIDDOWSON, o sal férrico é lavado uma vez com CIH n/6, a frio. A lavagem a quente com o mesmo ácido parece determinar, como o notámos, certa perda de P fítico, perda que se acentua à medida que se aumenta o número de lavagens, como se observa no quadro seguinte, para a obtenção do qual partimos duma solução de fitina extraída do milho amarelo:

Volume da solução fítica cm ³	Número de lavagens (a quente)	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.
4	1	2.55
4	2	2.43
4	3	2.31
4	4	2.13
4	5	2.00
4	6	1.94

Essas diferenças não se observam quando a lavagem se faz a frio, isto é, quando se suspende simplesmente o precipitado em *ClH* n/6, como o indicam os números seguintes:

Volume da solução fítica cm ³	Número de lavagens (a frio)	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.
4	1	2.67
4	2	2.61
4	3	2.55
4	4	2.61
4	5	2.61
4	6	2.55

A partir da segunda lavagem, os resultados são praticamente constantes, o que melhor se esclarecerá a seguir.

INFLUÊNCIA DA REPRECIPITAÇÃO DO FITATO DE FERRO: A lavagem a quente determina, a concluir-se dos números dados, perda de *P* fítico. A frio, ela apresenta o inconveniente de não eliminar, talvez, inteiramente, o *P* adsorvido pelo precipitado. A dissolução do fitato de ferro lavada duas vezes a frio, seguida da reprecipitação do mesmo e de duas lavagens a frio, permitiu-nos obter resultados constantes, que se reproduziam perfeitamente: a purificação do sal férrico parece ser, assim, maior e mais segura. O quadro seguinte documenta a asserção:

Volume da solução fítica cm ³	Número de lavagens antes da reprecipitação	Número de lavagens depois da reprecipitação	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.
4	2	1	2.49
4	2	2	2.43
4	2	1	2.43
4	2	3	2.49
4	2	2	2.49
4	2	2	2.43

INFLUÊNCIA DA ACIDEZ DO LÍQUIDO E DA PRESENÇA DE P NÃO FÍTICO :

RATHER e outros observaram que a exatidão do método de HEUBNER e STADLER não se afetava pela presença de compostos não fíticos do fósforo presentes em extratos vegetais. Os resultados por nós obtidos, e que aparecem no quadro seguinte, mostram que o mesmo se dá no caso da técnica descrita no presente trabalho :

Volume da solução fítica cm ³	P mineral adicionado mgr.	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.
4	0.00	2.49
4	0.00	2.49
4	0.50	2.43
4	0.75	2.49
4	1.00	2.49
4	2.00	2.49

REPRODUTIVIDADE DOS RESULTADOS: Com as modificações propostas, o método do fitato de ferro nos forneceu resultados perfeitamente reprodutíveis, como o demonstra o quadro seguinte, para a obtenção do qual empregamos uma solução de fitina obtida pela dissolução de 1 comprimido de "Fitina" de "Produtos Químicos Ciba Ltda.", em 1 litro de *CIH* n/2:

Solução de fitina cm ³	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.	Solução de fitina cm ³	P fítico em 100 cm ³ da solução mgr.
0.3	4.86	2.0	4.78
0.5	4.74	2.5	4.76
0.5	4.78	3.0	4.86
0.7	4.74	3.0	4.78
1.0	4.76	3.5	4.72
1.0	4.78	4.0	4.72
1.5	4.76	4.0	4.76
2.0	4.70	5.0	4.78

Média	4.7675
Erro médio	0.0437
Erro padrão	0.0109
Coefficiente de variação	0.9166

EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO

YOUNG, MAC CANCE e WIDDOWSON aconselham para a extração do ácido fítico o *CIH* n/2, em lugar do *CIH* a 2% habitualmente recomendado. Afim de verificar a influência da concentração do ácido

sobre a extração da fitina, empregando como fonte desta o milho amarelo e como solvente o *CIH* a diversas concentrações, fizemos experiências que se resumem no quadro seguinte:

<i>CIH</i>	Tempo de contacto Horas	<i>P</i> Fítico em 100 partes de substância seca
n/10	3	0.272
		0.272
		0.280
		} Média : 0.275
n/2	3	0.420
		0.415
		0.422
		} Média : 0.419
n	3	0.379
		0.390
		0.379
		} Média : 0.383

De acordo com esses números, sob condições semelhantes, pelo menos, o *CIH* n/10 é nitidamente inferior ao *CIH* n/2, ao passo que o *CIH* n parece favorecer certa hidrólise, durante o tempo indicado, ao menos. A proporção entre matéria seca e solvente por nós usada foi de 1:50 — 100.

O quadro seguinte mostra que duas horas de contacto entre material e solvente é tempo bastante para que a extração seja máxima:

Tempo de contacto Horas	<i>P</i> Fítico em 100 partes de substância seca
1	0.370
2	0.420
3	0.422
4	0.417
5	0.417
24	0.400

Esses números mostram que o espaço de tempo de duas a 4 horas é o mais indicado. Por via de regra, deixamos em contacto durante duas horas.

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO EM PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

Essa determinação se resume em duas fases, a saber:

- 1) extração do ácido fítico
- 2) determinação do mesmo na solução obtida.

1) **EXTRAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO:** Quantidade conveniente de substância seca — no caso de cereais, v.g., cerca de 30 a 50 mgr. — é posta em tubo de experiências de 200 x 20 mms. e tratada pelo *ClH* n/2 na proporção de 1:50 — 100. Agita-se energicamente, imprimindo-se ao tubo movimento circular, e deixa-se em contacto durante duas a tres horas, e nesse intervalo repetidamente se agita como ficou dito. Filtra-se por “baguette” filtrante, de vidro poroso, Jena G3, e extrai-se o máximo possível de líquido. Ao resíduo no tubo, sem que deste se retire a “baguette”, ajuntam-se 20 partes de *ClH* n/2 para uma de material, agita-se repetidamente durante 5 a 10 minutos, e filtra-se como anteriormente. Repetem-se as operações de lavagem. O extrato inicial e os demais líquidos recolhem-se diretamente num tubo graduado à altura de 2-3-4-5 e 10 cm³. Completa-se volume conveniente, marcado na parede do recipiente, e para tanto usa-se *ClH* n/2.

Convem notar que o volume de solvente a usar-se na extração, mais deve depender da riqueza em fitina do material em estudo do que da quantidade deste submetida à análise. Do extrato obtido tomam-se aliquotas convenientes para as operações seguintes.

2) **DETERMINAÇÃO DO P FÍTICO NO EXTRATO OBTIDO:** A precipitação e a lavagem do fitato de ferro; a reprecipitação do mesmo, para fins de purificação, e a lavagem que se segue, bem como a transformação do sal férrico em fitato de sódio, fazem-se de acordo com a técnica descrita no presente trabalho.

INCINERAÇÃO. Num tubo de experiências de vidro “Pirex”, de 200 x 20 mms. graduado à altura de 2,5 - 5 e 10 cm³, põe-se 1 cm³ de *SO₄H₂* 2 n, ajuntam-se a solução de fitato de sódio e o líquido de lavagem obtido pela dissolução e reprecipitação do hidróxido de ferro. Evapora-se o líquido cuidadosamente, até começo de formação de vapores sulfurosos, e termina-se a incineração de acordo com a técnica indicada em (20).

DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DO P. A solução sulfúrica obtida é diluída em 2 cm³ de água destilada e, em presença de traço de fenolf-taleína, tratada pelo *NaOH* 2 n até leve reação alcalina. Acidifica-se levemente por meio de duas ou tres gotas de *SO₄H₂* 2 n, dilue-se convenientemente, perfazendo-se volume exato marcado na parede do tubo, e homogeneiza-se a solução levemente ácida obtida, de que se tomam aliquotas convenientes para a determinação fotométrica do *P*, de acordo com o método descrito por SALOMÉ PEREIRA (21).

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS. A técnica descrita permitiu-nos a obtenção dos resultados que se veem no quadro seguinte, para

a consecução do qual usamos pesos diferentes de uma só amostra de milho amarelo:

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO NO MILHO AMARELO (*Zéa mais*, L.)

Substância seca mgr.	Volume do extrato cm ³	Parte alíquota tomada para a determinação cm ³	Volume da solução das cinzas cm ³	Parte alíquota tomada da solução das cinzas cm ³	P fítico %
55.60	10	4	10	1	0.43
76.40	10	4	10	1	0.42
34.90	7	4	10	1	0.43
35.80	5	2.5	10	1	0.43
63.30	10	4	10	2	0.42
42.80	7	4	10	1	0.42
55.50	10	3	10	1	0.42
81.60	10	2	10	1	0.42
39.80	7	3	10	2	0.43
86.40	10	2	5	1	0.42
37.50	7	3	10	1	0.43
50.40	10	4	10	2	0.42
39.90	10	4	10	2	0.42
41.10	5	4	10	0.5	0.41
38.80	10	3	5	1	0.43
63.50	10	4	10	1	0.42

Média	0.4231
Erro médio	0.006
Erro padrão	0.0015
Coefficiente de variação	1,418

RECUPERAÇÃO. A amostra de milho que serviu nas experiências anteriores, foi a usada para a obtenção do quadro que se segue:

EXPERIÊNCIAS DE RECUPERAÇÃO

Substância seca mgr.	P fítico inicial mgr.	P fítico adicionado mgr.	P fítico total achado mgr.	P fítico recuperado mgr.	P fítico recuperado %
64.40	0.270	0.191	0.456	0.186	97,91
44.40	0.186	0.024	0.208	0.022	91,67
43.40	0.182	0.048	0.226	0.044	91,67
47.40	0.199	0.096	0.292	0.093	96,88
45.40	0.191	0.144	0.328	0.137	95,14
53.90	0.226	0.024	0.248	0.022	91,67
49.30	0.207	0.048	0.252	0.045	93,75
36.80	0.155	0.096	0.246	0.091	94,79
48.50	0.204	0.191	0.393	0.189	98,95
38.50	0.162	0.191	0.346	0.187	97,91
34.00	0.143	0.024	0.167	0.024	100,00
40.70	0.171	0.048	0.222	0.051	106,25
38,40	0.161	0.096	0.255	0.094	97,92
86.40	0.363	0.072	0.428	0.065	90,28

As variações notadas caem dentro dos limites de erros praticamente inevitáveis em trabalhos dessa natureza.

*
* *
*

As modificações introduzidas no método de MAC CANCE e WIDDOWSON, e expostos na presente contribuição, permitem que se obtenham, de modo relativamente rápido, seguro, exato e sensível, resultados plenamente satisfatórios, pelo menos no caso de produtos de origem vegetal, que foram usados pelo autor na elaboração deste trabalho.

À guisa de informação, damos a seguir a quantidade de *P* fítico encontrada em alguns alimentos muito comuns no Brasil. As variedades de milho citadas proveem dos campos de cultura da “Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, de Piracicaba, e nos foram gentilmente cedidas pelo Prof. CARLOS TEIXEIRA MENDES, a quem aqui deixamos consignados os nossos agradecimentos; as leguminosas originam-se de culturas feitas no município da Capital (São Paulo). Os resultados são expressos em “percento de matéria seca”.

	<i>P</i> total %	<i>P</i> fítico %	<i>P</i> fítico % em relação ao <i>P</i> total
Milho Amparo	0.431	0.293	67.98
» Amarelão	0.574	0.311	54.18
» Santa Rosa	0.328	0.163	49.69
» Cristal	0.410	0.273	66.59
» Cateto	0.307	0.218	71.01
Feijão Mulatino	0.512	0.367	71.68
» Roxo	0.553	0.368	66.55
» Preto	0.488	0.209	42.83
» Fradinho	0.355	0.160	45.07
» Branco	0.412	0.213	51.72
Ervilha verde	0.253	0.080	31.62

Summary

In view of the significance of phytic acid in the diet, particularly in those countries where most of the dietary “P” is derived from cereals, either whole or milled, the present study was made. A method for the determination of the phytic acid phosphorus contents of feeding stuffs is described. The method is essentially that of MAC CANCE and WIDDOWSON, modified as follows, in order to determine minute quantities of phytin:

1) *Phytin is extracted in test tubes 200 x 20 mms. with $n/2$ H Cl, during 2-3 hours, filtered through a sintered glass filtering stick, Jena G 3. The residue in the test tube is washed twice with $n/2$ H Cl. The filtrate and washings are mixed and a known appropriate volume is made up with $n/2$ H Cl.*

2) *Aliquots containing at least 10 micrograms of phytic acid phosphorus per ml. are taken for analysis. Place 0.5 to 4 ml. of the phytic acid solution in a centrifuge tube graduated at 1-1.5-2-2.5-3-3.5-4 and 5 ml., make slightly alkaline to phenolphthalein with 5 n NaOH, add n H Cl drop by drop until faintly acid, dilute with distilled water to the nearest mark on the wall of the tube, add 0.2 ml. of a ferric chloride solution in n H Cl containing 0.5 mgr. of Fe per ml., per ml. of the phytic acid solution, heat in a boiling water-bath for 10 minutes. Cool, centrifuge, pour off the supernatant liquid, stir up the precipitate with cold $n/6$ H Cl, centrifuge, decant the acid. Repeat the washing.*

3) *Dissolve the ferric phytate with $n/2$ NaOH, neutralise with $n/2$ H Cl add 0.2 ml. of the ferric chloride solution per ml. of the phytic acid solution, heat in a boiling water-bath for 10 minutes, cool, centrifuge, decant the supernatant liquid, wash twice with $n/6$ H Cl, as above.*

4) *Dissolve the so purified ferric phytate with $n/10$ NaOH, heat in a boiling water-bath until all iron is precipitated as $Fe(OH)_3$, cool, centrifuge, transfer the sodium phytate solution to a Pyrex test tube graduated at 5 and 10 ml. Dissolve the ferric hydroxide with $n/10$ H Cl precipitate again the ferric hydroxide in a boiling water-bath, cool, centrifuge, transfer the supernatant liquid to the graduated Pyrex test tube containing the sodium phytate solution.*

5) *Add 1 ml. of 2 n H_2SO_4 to the sodium phytate solution, heat carefully on a small flame, with continuous shaking, until acid fumes begin to form and the solution starts charring. Heating is stopped at this stage, and 0.5 ml. of a nitric-perchloric acid mixture (3:1) is added. The test tube is gently heated until dense fumes of perchloric acid begin to form. The solution is ordinarily colourless at this stage. Otherwise further additions of the acid mixture are made as the solution begins to char until the oxidation has practically ceased. The test tube is then heated more vigorously until the perchloric acid has been completely eliminated and most of the sulfuric acid has evaporated. 2 to 4 ml. of distilled water are added, and the test tube is slightly heated and then cooled. The clear solution is made slightly alkaline to phenolphthalein and then faintly acid with a few*

drops of n H_2SO_4 . The contents of the tube are then diluted to an appropriate volume. A blank is carried at the same time, under exactly the same conditions, to serve as compensating liquid. Aliquots are taken for the photometric determination of phosphorus.

6) *Phosphorus is determined by the method of SALOMÉ PEREIRA (21).*

BIBLIOGRAFIA

- 1) PLIMMER, R. H. A. — 1913 — *Bioch. Jour.*, 7:43.
- 2) MELLAMBY, E. — 1926 — *Brit. Med. Jour.*, 1 (3403): 515.
- 3) GREEN, H. N. — MELLAMBY, E. — 1928 — *Bioch. Jour.*, 22:102.
- 4) MELLAMBY, E. — 1926 — *Jour. Physiol.*, 61:XXIV.
- 5) BRUCE, H. M. — CALLOW, R. K. — 1934 — *Bioch. Jour.*, 28:517.
- 6) LECOQ, R. — BARBAN, M. L. — 1935 — *Compt. Rend.* 118:867.
- 7) MAC CANCE, R. A. — WIDDOWSON, E. M. — 1935 — *Bioch. Jour.*, 29:2694.
- 8) LOWE, J. T. — STEENBOCK, H. — 1936 — *Bioch. Jour.*, 30:1126.
- 9) FONSECA RIBEIRO, D. — 1941 — Cárie dentária — S. Paulo, Cia. Melhoramentos.
- 10) EASTCOTT, E. V. — 1928 — *Jour. Phys. Chem.*, 32:1094.
- 11) WOOLLEY, D. W. — 1940 — *Jour. Biol. Chem.*, 136:113.
- 12) WOOLLEY, D. W. — 1941 — *Jour. Biol. Chem.*, 139:29.
- 13) HEUBNER, W. — STADLER, H. — 1914 — *Bioch. Zeitschr.*, 64:422.
- 14) AVERILL, H. P. — KING, C. G. — 1926 — *Jour. Am. Chem. Soc.*, 48:724.
- 15) YOUNG, L. — 1936 — *Bioch. Jour.*, 30:252.
- 16) COMMON, R. H. — 1940 — *The Analyst*, 65:79.
- 17) LEVA, E. — RAPOPORT, S. — 1941 — *Jour. Biol. Chem.*, 141:343.
- 18) MICHELL-DURAND, E. — 1938 — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 20:413.
- 19) WOOLLEY, D. W. — 1941 — *Jour. Biol. Chem.*, 140:453.
- 20) SALOMÉ PEREIRA, R. — 1941 — *Jour. Biol. Chem.*, 137:417.
- 21) SALOMÉ PEREIRA, R. — 1939 — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21:827.