

Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia

Diretor: Prof. Dr. Z. Vaz

SÔBRE A DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DO MAGNÉSIO NOS PRODUTOS DE ORIGEM BIOLÓGICA

Rubens Salomé Pereira

Docente-livre da Universidade de São Paulo

O magnésio, corpo indispensável ao desenvolvimento normal dos processos metabólicos, intervem em alguns dêles de modo ainda mal definido. Transtornos que podem chegar a ser extremamente graves, e até mortais, determinam-se pela supressão, ou mesmo pela simples diminuição dêsse elemento na dieta. (1-2) Na deficiência experimental do magnésio observa-se que o plasma se empobrece dêsse metal, a comêço, e que, ao cabo de certo tempo, a taxa se eleva, o que talvez se deva à menor eliminação por via renal, à mobilização do que se encontra nos tecidos, e à ação da hipófise. (3) DUCKWORTH e seus colaboradores (4) observaram que dietas extremamente pobres de magnésio — 6 p. p. m. — determinavam a cessação do crescimento de ratos, quatro dias após se haverem iniciado as experiências, e que, vinte e quatro dias mais tarde, nenhum animal sobrevivia. As rações dadas causavam progressiva descalcificação do sistema ósseo, demonstrada pela baixa percentagem de cinzas; o teor de magnésio se reduzia nos ossos, ao passo que a percentagem do cálcio se elevava e que a do fósforo permanecia praticamente constante.

O emprêgo de dietas deficientes de magnésio, permitiu a DUCKWORTH e a GODDEN (5) notar que os ratos submetidos às provas duravam mais e que a vasodilatação era menos intensa e mais tardia quando a relação $Ca : Mg$ se abaixava. Os referidos pesquisadores observaram, além disso, que o magnésio presente no tecido osseo parecia mobilizar-se mais intensamente quando na ração se achava menor quantidade de cálcio. Os autores citados explicam essa fase da série de fenômenos que se produzem na deficiência magnesiana, pela mobilização rápida do metal que se encontra de reserva nos ossos, afim de se atenderem as requisições dos tecidos moles, e pela cessação ulterior dêsses fenômenos.

BODANSKY (6) acha que o magnésio acelera a velocidade inicial da reação das fosfatases renais, e das intestinais, e que, em presença

Trabalho realizado no Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, e no Laboratório de Fisiologia Geral e Animal, do Departamento de Zoologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da mesma Universidade, com o auxílio dos "Fundos Universitários de Pesquisas".

de concentrações ótimas de glicina e do referido corpo, a velocidade é diretamente proporcional à quantidade das enzimas citadas.

SJOLLEMA (7) descreveu a moléstia do gado conhecida pelo nome de “tetania das gramíneas”, e pelo de “tetania dos campos”, de que os sintomas nervosos mais evidentes são irritação motora e parestesia. O índice de mortalidade é alto, e sempre muito baixa é a percentagem de magnésio no sangue. METZGER (8) achou que êste elemento se reduzia sensivelmente no sôro sanguíneo — de 2.45 mg per 100 cm³ para 0.145 mg — e que o mesmo se dava com o cálcio — de 9.6 mg para 7.5 mg — e com o fósforo inorgânico — de 5.3 mg para 2.3. Essa doença foi assinalada na Inglaterra, na Nova-Zelândia (9), nos Estados Unidos da América do Norte (10-11). NOLAN e HULL acharam sistematicamente, nos doze casos reportados, baixa percentagem, no sôro sanguíneo, de magnésio — 0.46 mg per 100 cm³ — de cálcio — 6.3 mg — de fósforo — 3.29 mg. Segundo TRUM, a tetania dos campos causa, no Estado de Nebraska, maior perda de gado do que tôdas as demais doenças reunidas.

Graças à diversidade dos métodos usados e ao número, relativamente pequeno, de casos estudados, há ainda divergências em relação à amplitude da variação do magnésio no sangue normal. À vista dos problemas que aguardam investigações mais extensas e que se relacionam com o papel biológico desempenhado por êsse elemento, o estudo de métodos que permitam que se realizem pesquisas nesse campo, será bem recebido. No desenvolvimento de programa de trabalhos sôbre a possível toxicidade do diclorodifeniltricloreto — DDT — (12), e sôbre a composição mineral do sangue de certos invertebrados e a de soluções perfusoras (13-14), houve necessidade de se estudar processo conveniente de determinação do magnésio em quantidades por vezes extremamente reduzidas, de material: o presente trabalho é a resultante dessas pesquisas.

Vários métodos têm sido propostos para a dosagem de pequenas quantidades de magnésio em produtos de origem biológica. Esse elemento pode isolar-se sob forma de fosfato amoníaco-magnésiano e determinar-se indiretamente por meio de fósforo presente no precipitado. Assim o fizeram TSCHOPP (15), BRIGGS (16), e outros. Os processos indicados para a determinação dos fosfatos podem, em geral, servir (17).

A determinação direta do magnésio se baseia na formação de laca do hidróxido com um corante orgânico. A côr dada pelo sal de sódio do ácido dehidrotio —p— toluidina sulfônico (18), foi aproveitada por BECKA (19), por URBACH (20), por HIRSCHFELDER e seus colaboradores (21), por HAURY (22), por OTTO (23), por GILLAM (24),

e por outros. Podem-se obter-se suspensões coloidais de razoável estabilidade quando a quantidade de magnésio se situar às voltas de 5 p.p.m. no máximo e, segundo GINSBERG (25), a formação da laca segue as leis simples da adsorção. O método, de alta sensibilidade, é sujeito à interferência de vários elementos e a lei de LAMBERT-BEER só é válida entre limites muito estreitos.

THIEL e van HENGEL (26) propuzeram o método que se funda na formação de laca azul, produzida pelo hidróxido de magnésio em presença da 1,2, 5, 8 — oxiantraquinona (27). A reação é extremamente sensível, mas o processo se sujeita a várias interferências.

A determinação conjunta do cálcio e do magnésio, nefelométricamente, por meio do ferrocianeto de potássio em meio alcoólico (28-29), e a do cálcio, por intermédio do sulforicinoleato de sódio em presença do íon amônio (30), o que permite determinar ambos os metais por diferença, são processos que têm sido aconselhados.

LANG (31) propoz dosar-se o magnésio por meio da tropeolina OO. O método consiste em isolar-se o sal de magnésio do ácido p-benzeno-sulfônico azo-difenilamina, extremamente pouco solúvel — cerca de 1:10.000.000 — e em dissolver-se o precipitado em ácido sulfúrico: desenvolve-se cor vermelho-violeta intensa. A grande dificuldade do processo está na lavagem eficiente do sal, e para eliminá-la, HAVINGA e BALLOT (32) aconselham usar volume conhecido do reagente para a precipitação, centrifugar e tomar alíquota do líquido sobrenadante.

Após os trabalhos de BERG (33), o emprêgo da oxina — (8-hidroxiquinolina) — para fins analíticos tem sido largamente recomendado, particularmente depois que se publicaram micrométodos para a determinação da oxina (34-35-36-37-38-39-40-41).

A 8-hidroxiquinolina, reagente de precipitação, dá com numerosos íônios, complexos dos quais muitos têm sido amplamente usados para fins quantitativos. Ela não apresenta, pois, caracter de especificidade, mas permite que se efetue com segurança o isolamento de numerosos elementos graças à diferença de comportamento deles quando, em presença do referido reativo, se altera a concentração dos íônios hidrogênio da solução, ou quando a esta se ajuntam corpos capazes de impedir a produção de determinadas reações.

O hidroxiquinolato de magnésio é corpo de composição constante, de baixa solubilidade — 1:410.000 em meio amoniacal; 1:270.000 em solução alcalina (Na OH) e em presença de tartaratos — de sorte que a oxina é reagente que muito se recomenda para a determinação desse elemento.

O método que se estuda no presente trabalho, baseia-se nos pontos seguintes:

- 1) separação dos elementos precipitáveis pela oxina em meio ácido;
- 2) separação do cálcio sob forma de oxalato. Este precipitado se reserva para a determinação do cálcio, de acôrdo com o método que será descrito adiante.
- 3) precipitação do oxinato de magnésio em meio amoniacal;
- 4) determinação indireta do magnésio por via fotométrica, por meio da copulação da oxina com ácido naftiônico diazotado.

MÉTODOS

Reagentes necessários.

- a) *Vermelho de metila*. — Solução a 0.02% em álcool etílico a 96%.
- b) *Acetato de sódio*. — Solução saturada a frio.
- c) *Ácido acético*. — Ácido acético glacial diluído em água na proporção de 1:4.
- d) *8 — hidroxiquinolina acética*. 5 gr. de 8 — hidroxiquinolina “para fins analíticos” tratam-se com 10 cm³ de ácido acético glacial e tudo se aquece em banho-maria fervente até haver-se solubilizado a oxina. A solução obtida ajunta-se aos poucos água quente até se conseguir volume de cerca de 80 cm³. Adiciona-se então, gota a gota, licor amoniacal de densidade 0.91 até o líquido começar a turvar-se. Ajunta-se agora o reativo (c), cuidadosamente, afim de obter-se solução perfeitamente límpida. Deixa-se esfriar e perfaz-se volume de 100 cm³ com água. Filtra-se por filtro de vidro de fundo poroso e conserva-se em frasco escuro, de rolha esmerilhada.
- e) *Amoníaco*. — Solução 0.15 N.
- f) *Solução de ácido oxálico em ácido clorídrico*. 0.45 gr. de ácido oxálico anidro dissolvem-se em 50 cm³ de ácido clorídrico 0.1 N, num balão volumétrico de 100 cm³. Completa-se o volume com água destilada.
- g) *Oxalato de amônio*. Solução saturada a frio.
- h) *Solução amoniacal saturada de oxalato de cálcio*. Saturase de oxalato de cálcio uma solução amoniacal obtida pela diluição de 2 cm³ de licor amoniacal d = 0.91, a 100 cm³. Filtra-se por filtro de vidro poroso, imediatamente antes de usar-se.
- i) *Cloreto de amônio*. Solução saturada a frio.
- j) *Amoníaco*. Licor amoniacal de densidade 0.91.

k) *Solução saturada de oxinato de magnésio.* 100 cm³ duma solução de cloreto de magnésio em que haja cêrca de 10 mgr. do metal, tratam-se com 5 cm³ de (i), com 5 cm³ de (d) e levam-se a banho-maria cuja temperatura se manterá entre 70° e 80° C. Agita-se com bastonete de vidro e ajunta-se (j) até o líquido se mostrar alcalino e, ainda, excesso de cêrca de 10 gotas. Deixa-se em repouso durante cêrca de uma hora à temperatura ambiente, filtra-se por filtro de vidro poroso, Jena G3, lava-se o precipitado com amoníaco diluido (1:25) até eliminar-se todo o excesso de oxina e, em seguida, com etanol a 95%. Passa-se o precipitado para um frasco de rolha esmerilhada e ajunta-se-lhe 1 litro — ou mais — de mistura feita de alcool etílico a 95% e de amoníaco a 10% na proporção de 1: 1. Filtra-se imediatamente antes de usar-se.

l) *Ácido clorídrico.* Solução 0.1 N.

m) *Solução de ácido naftiônico.* 1.12 gr. de ácido naftiônico tratam-se com 10 cm³ de hidróxido de sódio 0.1 N e ajuntam-se 90 cm³ de água distilada. Filtra-se e conserva-se em frasco escuro, de rolha esmerilhada.

n) *Ácido clorídrico.* $d = 1.19$.

o) *Nitrito de sódio.* Solução a 3.45 gr. per 1000 cm³.

p) *Hidróxido de sódio.* Solução 8 N.

Todos os reagentes usados devem ser do mais alto gráo de pureza, "*pro analysi*", e as soluções se devem conservar em frascos de vidro *Pyrex*, preferivelmente.

Em um tubo de centrifugação pequeno, de fórmula cônica, de reduzido diâmetro na extremidade inferior, põe-se volume conveniente — 0.5 a 1cm³ — da solução em que se vai determinar o magnésio, que deve ser levemente ácida e na qual deve haver pelo menos 10 microgramas do referido metal per cm³. Em presença de (a), ajunta-se o reagente (b), cuidadosamente, até o líquido apresentar coloração levemente avermelhada, sem chegar, porém, ao amarelo; adicionam-se duas ou três gotas de (c) para que a côr se torne mais nitidamente vermelha (pH — 4.5-5.3), e depois 0.1 cm³ de (d). Leva-se ao banho-maria aquecido a 80° 90° C e aí se deixa durante cêrca de 10 minutos. Centrifuga-se e passa-se o líquido sobrenadante para um funil pequeno de vidro, de fundo poroso, Jena G3, adaptado, por meio de rolha de borracha, à boca de um frasco de Kitasato em cujo interior se encontra, para recolher os filtrados, um tubo de centrifugação graduado à altura de 1,5,7.5 e 10 cm³. O tubo em que se realizou a precipitação e o funil, lavam-se com três porções de água distilada quente: a primeira, de 1 cm³ e as restantes, de 0.5 cm³ cada uma. Lavagem efi-

ciente pode realizar-se da maneira seguinte: de pipeta de ponta fina deixa-se escorrer ao longo das paredes do tubo 1 cm³ de água e, mantendo-se êste entre o polegar e o indicador de uma das mãos, com os dedos da outra dão-se pancadas leves, rápidas e sucessivas ao longo do terço inferior do mesmo. Reunem-se todos os filtrados, e o tubo graduado que os contem, leva-se ao banho de ar aquecido e de temperatura regulada às voltas de 120° C, até, se fôr o caso, o volume reduzir-se a cêrca de 1 cm³. Nesta altura, se houver esmaecimento da côr, intensifica-se a mesma pela adição de duas gotas de (c) de sorte a fazer-se o pH da solução volver ao indicado anteriormente (pH-4.5-5.3). Ajuntam-se 0.2 cm³ de (e) e 0.2 cm³ de (f) e mergulha-se o tubo em banho-maria fervente, durante cêrca de 10 minutos. Arrolha-se o tubo e abandona-se à temperatura ambiente por espaço de meia hora. Adicionam-se, então, 0.3-0.4 cm³ de (g) e repete-se o aquecimento em banho-maria pelo mesmo espaço de tempo (10 minutos). Retira-se o tubo do banho-maria, ajuntam-se 4-6 gotas de etanol a 95%, para desfazer qualquer pelicula formada á superficie do líquido, e centrifuga-se durante 5 minutos a 2.500-3000 r.p.m. Deixa-se em repouso, então, e ao cabo de 5 horas, no mínimo, de novo se centrifuga, enèrgicamente, durante 10-15 minutos, a 2,500-3000 r.p.m. Si o precipitado bem se tiver acamado no fundo do tubo, a solução sobrenadante poderá ser decantada sem que se sofram perdas de oxalato precipitado. Êste se lava duas vêzes com (h); emprega-se para tanto, 1 cm³ dêste por vez, e segue-se a técnica descrita. Os líquidos resultantes dessas operações se reúnem num tubo de centrifugação semelhante ao em que se realizou a precipitação do cálcio.

À solução em que se vai determinar o magnésio ajuntam-se 0.5 cm³ de (i), 0.1 cm³ de (d) e, gota a gota, o reagente (j) até o líquido tornar-se alcalino e, ainda, excesso de 6-8 gotas. Homogeniza-se por meio de bastonete fino, de vidro, e mergulha-se o tubo em banho-maria cuja temperatura se mantém entre 70°-80° C. Ao iniciar-se a turvação, o que em geral leva 2-3 minutos e depende da quantidade de magnésio presente, retira-se o bastonete e êste se lava com fino jacto de etanol a 95% que se deve ajuntar ao líquido de fórma a dispor-se em camada de cêrca de 1cm³ afim de evitar-se que o oxinato de magnésio formado na parte superior da solução suba pelas paredes do tubo e torne extremamente penosa a sua incorporação ao grosso do precipitado. O aquecimento se prolonga por espaço de 15 minutos e, depois de deixar-se o tubo em repouso à temperatura ambiente durante uma hora, ou mais, centrifuga-se enèrgicamente durante 15 minutos, a 2.500-3000 r.p. m. Por meio de tubo de extremidade capilar recurva-

da, aspira-se cuidadosamente o líquido sobrenadante, deixando-se, apenas, cêrca de 0.2 cm³, afim de evitar-se que o precipitado se ponha em suspensão. Êste se lava em seguida com (k). Ajuntam-se 2 cm³ dêste e neles se suspende o precipitado, de acôrdo com a técnica descrita, e acrescentam-se mais 8 cm³ que se deixam cair de pipeta de vasamento fino e escorrer ao longo das paredes. Centrifuga-se e aspira-se o líquido, como anteriormente. Repetem-se as operações de lavagem, e desta vez decanta-se o líquido cuidadosamente, para evitar de todo perdas de precipitado, e inverte-se o tubo sôbre camada de algodão recoberta de papel de filtro, posta em copo de boca larga. Deixa-se o líquido escorrer bem, enxuga-se a boca do tubo com auxílio de papel de filtro sem fibras e de novo se lava como acima, por decantação. O precipitado assim lavado dissolve-se em (1). Depende da quantidade de magnésio presente o empregar-se a totalidade da solução, ou apenas parte da mesma, para a determinação fotométrica.

O oxinato assim dissolvido passa-se para um balão volumétrico de capacidade conveniente, e a êste se ajunta água até perfazer cêrca de 2/3 do volume do mesmo. Para cada 100 cm³ de volume final da solução colorida, ajuntam-se 1 cm³ de (m), 0.1 cm³ de (n) e 1 cm³ de (o); agita-se bem e, ao cabo de 2 minutos, adicionam-se 10 cm³ de (p). Completa-se o volume do balão com água destilada, homogeniza-se bem a solução e 15 minutos mais tarde, pelo menos, determina-se a extinção dada pelo fotômetro gradual de ZEISS-PULFRICH, interpondo-se o filtro S-50, usando-se cuba de espessura conveniente e um branco de todos os reagentes, feito ao mesmo tempo, em tôdas as fases do processo, exatamente nas mesmas condições, como líquido de compensação.

ESCOLHA DO FILTRO E INFLUÊNCIA DO BRANCO. Uma solução corada obtida de acôrdo com a técnica descrita revelou, ao determinar-se a transparência dada pela interposição dos vários filtros S, tendo-se usado água destilada como líquido de compensação, as extinções dadas no quadro I.

QUADRO I

Transparência dada pela mesma solução corada, em várias regiões do espectro

Compensação: água destilada.

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	51	0.292	S-53	28	0.553	S-61	88	0.055
S-45	41	0.387	S-55	35.5	0.450	S-66	96	0.018
S-47	36	0.444	S-57	59	0.229	S-72	neg.	—
S-50	26.6	0.575	S-59	68	0.167	S-75	neg.	—

Substituindo-se a água destilada por um “branco dos reativos”, obtiveram-se os resultados que se vêem no quadro II.

QUADRO II

Transparência dada pela mesma solução corada, em várias regiões do espectro

Compensação: branco.

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	55	0.260	S-53	28.8	0.541	S-61	90	0.046
S-45	44	0.356	S-55	36.4	0.439	S-66	96	0.018
S-47	38	0.420	S-57	60	0.222	S-72	100	0.000
S-50	27.6	0.559	S-59	69	0.161	S-75	100	0.000

A medida da absorção do “branco dos reativos”: água até 75 cm³, 1 cm³ de (m), 1 cm³ de (n), 0.1 cm³ de (o), 5 cm³ de (p) e volume final de 100 cm³ — feita em relação à água destilada, em cubas de 50 mms de espessura e pela interposição dos vários filtros S, revelou o que se vê no quadro III.

QUADRO III

Transparência dada pelo branco dos reativos, em várias regiões do espectro

Compensação: água destilada.

Espessura da cuba: 50 mm.

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	72	0.029	S-53	90	0.009	S-61	100	0.000
S-45	73	0.027	S-55	93	0.006	S-66	neg.	—
S-47	77	0.023	S-57	96	0.004	S-72	neg.	—
S-50	84	0.013	S-59	100	0.000	S-75	neg.	—

Esses quadros mostram que o filtro S-50 é o que mais se recomenda para as medidas de transparência das soluções coradas obtidas pelo método descrito, e que, para fins de compensação, deve-se usar um “branco”.

INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DOS REAGENTES (M), (N), (O) e (P). Emprêgo de quantidade duas vezes maior de (m) do que a indicada no *Método*, não causa modificação da transparência, mas excessos mais largos são prejudiciais, como o demonstra o quadro IV.

QUADRO IV

Influência da quantidade do reagente (m) sobre a extinção.

Compensação: — água destilada.

As quantidades de (n), (o) e (p) foram as indicadas no "Método", e as de *Mg* foram as mesmas em todos os casos.

Reagente (m) cm ³	D	k
1	36	0.444
2	36	0.444
4	30	0.523
5	29	0.538

Tanto o reagente (n) — pelo menos até o máximo de 1 cm³ per 100 cm³ da solução colorida — como o (o) — até cinco vezes mais do que o que se indicou no "Método" — não exercem influência desfavorável quando usados em excesso, como o indicam os quadros V e VI.

QUADRO V

Influência da quantidade do reagente (n) sobre a extinção.

Compensação: — água destilada.

As quantidades de (m), (o) e (p) foram as indicadas no "Método" e as de *Mg* foram idênticas às do quadro IV.

Reagente (n) cm ³	D	k
0.1	36.4	0.439
0.2	36.4	0.439
0.5	37	0.432
0.8	36.8	0.434
1.0	36.4	0.439

QUADRO VI

Influência da quantidade do reagente (o) sobre a extinção.

Compensação: — água destilada.

As quantidades de (m), (n) e (p) foram as indicadas no "Método", e as de *Mg* foram idênticas às dos quadros anteriores.

Reagente (o) cm ³	D	k
1.0	36	0.444
1.5	36.4	0.439
2.0	36	0.444
3.0	36.8	0.434
4.0	36.4	0.439
5.0	36.8	0.434

A constância da côr depende, em parte, da quantidade de hidróxido de sódio, e também da de magnésio, sob fórmula de oxinato, e do volume final da solução corada.

Pequeno excesso de reagente (p) em relação ao volume necessário para alcalinizar a solução, determina alterações da transparência que, em relação a soluções mais fortemente alcalinas, dentro do mesmo espaço de tempo, causam indecisões quanto ao valor real das extinções lidas. O tom levemente castanho que então se produz, talvez se deva (41) ao resultado de copulação entre o ácido naftiônico livre e o diazotado. Para efeito de segurança, pois, é necessário ajuntar-se excesso de reagente (p).

QUADRO VII

Influência do reagente (p).

Compensação: — água destilada.

As quantidades de (m), (n) e (o) foram as indicadas no "Método", e as de Mg foram as mesmas em todos os casos.

As leituras foram feitas 15 minutos depois da adição dos reativos mencionados.

Reagente (p) cm ³	D	k
1	34.6	0.461
5	36	0.444
10	36	0.444

INFLUÊNCIA DO VOLUME DA SOLUÇÃO CORADA SOBRE A EXTINÇÃO.

A grandeza da extinção das soluções coradas obtidas de acordo com a técnica descrita no presente trabalho, depende também do volume das mesmas o qual, por sua vez, é variável e dependente da quantidade de oxina presente sob fórmula de oxinato de magnésio. Si a quantidade deste, em relação ao volume final do soluto colorido, for muito grande, o líquido se apresenta turvo e a transparência dada é inferior à calculada. Mantendo-se, porém, a relação *oxinato de magnésio: volume da solução corada* dentro de limites razoáveis, compatíveis com as condições da determinação, os resultados analíticos não se alteram pela mudança do volume final.

QUADRO VIII

Influência do volume da solução corada sobre a extinção.
Compensação: branco.

Quantidade de solução de oxinato de magnésio tomada cm ³	Volume da solução corada cm ³	Espessura da cuba usada mms.	D	E	k
1	25	5	37.2	0.430	0.860
1	50	10	37	—	0.432
1	100	20	37	0.432	0.216
2	50	5	36.8	0.434	0.868
4	100	5	37.2	0.430	0.860

RELAÇÃO "OXINATO DE MAGNÉSIO: VOLUME FINAL DA SOLUÇÃO CORADA". Si a quantidade de oxinato de magnésio fôr muito elevada em relação ao volume final da solução colorida, esta se turvará e a transparência será superior à esperada. Para se conseguirem resultados aproveitáveis, pois, é necessário que estabeleçam relações entre êsses valores. Os melhores dados nós os obtivemos com concentrações mantidas entre 5 e 75 microgramas de magnésio per 100 cm³ de solução corada. De acôrdo com os números que se vêem no quadro VIII, a mudança dos volumes finais dos solutos coloridos permite que se variem grandemente essas quantidades.

PERSISTÊNCIA DA CÔR. Como se disse, a persistência da côr depende também da concentração do hidróxido de sódio na solução, do volume desta, da quantidade de oxinato presente. A coloração desenvolvida nas condições descritas no presente método — mínimo de 5 cm³ de reagente (p) per 100 cm³, quantidades de oxina correspondentes a 5-50 microgramas de magnésio — revelou pequeníssimas variações da transparência, inteiramente atribuíveis a êrros de leitura, quando esta se fazia entre 15 minutos e 5 horas, tempo contado a partir do momento da adição do reagente (m). Deixada à luz difusa, a solução, ao cabo de 50 horas, tomava côr castanha e o corante se apresentava em flocos no fundo do vaso. Por via de regra, as extinções se devem determinar dentro das primeiras duas horas a partir do momento em que se desenvolve a côr, que deve ser límpida, sem indício algum de turvação.

A LEI DE LAMBERT - BEER. *Determinação do coeficiente numérico.* A intensidade da côr dada por uma solução de oxinato de magnésio, desenvolvida de acôrdo com a técnica descrita no presente trabalho

e dentro dos limites de concentração indicados, é determinada pela quantidade de oxina presente na solução que se analisa. A relação entre êsses dois fatores — densidade ótica e percentagem de oxina — permite que se determine a percentagem de magnésio existente numa solução pela simples multiplicação dos valores da extinção por um fatôr constante, o que evita a construção de curvas de referência empíricas, sempre fastidiosas, e torna o trabalho mais cômodo e mais seguro.

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

QUADRO IX

Relação entre concentração de magnésio — c — e coeficiente de extinção — k —.

Quantidade de magnésio per 100 cm ³ mg.	Espessura da cuba usada mms.	D	E	k	c
					k
0.005	50	32.4	0.490	0.098	0.0510
0.010	20	39.6	0.402	0.201	0.0498
0.015	10	49.5	—	0.305	0.0492
0.020	10	38.6	—	0.413	0.0484
0.025	10	32	—	0.495	0.0505
0.030	10	25.4	—	0.595	0.0504
0.035	5	43.5	0.362	0.724	0.0483
0.040	5	40	0.398	0.796	0.0503
0.045	5	35.4	0.451	0.902	0.0499
0.050	5	31.6	0.500	1.000	0.0500
0.055	5	28.4	0.547	1.094	0.0503
0.060	5	24.4	0.613	1.226	0.0489
0.065	5	22.4	0.650	1.300	0.0500
0.070	5	19.8	0.703	1.406	0.0498
0.075	5	17.6	0.755	1.510	0.0497

Média	0.0498
Erro médio	0.0008
Erro padrão	0.0002
Coeficiente de variação	1.606%

DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO EM PRODUTOS BIOLÓGICOS

A determinação do magnésio na matéria orgânica resolve-se em duas fases principais:

- 1) incineração da substância.
- 2) determinação do magnésio nas cinzas obtidas.

INCINERAÇÃO DA SUBSTÂNCIA. No caso de substâncias relativamente ricas de magnésio, como o sangue de animais marinhos, o feijão soja, a torta de sementes de algodão, etc., a quantidade a tomar-se para a análise pôde ser consideravelmente reduzida, e a incineração poderá ser feita de acôrdo com a técnica descrita em (42). Si a percentagem dêsse metal fôr baixa no material que se analisa, como se dá com o sangue do homem, por exemplo, o que requer se tomem porções maiores para a incineração, esta se fará de acôrdo com as indicações encontradas em (43), preferivelmente.

Depois de findo o ataque nitro-perclórico e de se haverem destruído os percloratos formados, o resíduo se dissolve em quantidade tal de $Cl H O.1 N$ que a acidez do líquido, após se haver diluído a volume conveniente e exáto, se sitúe às voltas de $0.05 N$.

DETERMINAÇÃO DO MAGNÉSIO NA SOLUÇÃO DAS CINZAS. Uma aliquota da solução clorídrica das cinzas passa-se para um tubo de centrífuga, de fôrma cônica, de vidro Pyrex, e trata-se exatamente de acôrdo com o que foi descrito em "Método". Faz-se ao mesmo tempo, rigorosamente sob as mesmas condições, um branco em que se levem em consideração todos os reagentes usados em tôdas as fases da determinação, que servirá de líquido de compensação.

QUADRO X

Determinação do magnésio no sôro de *Callinectes danae* SMITH

Volume de sôro tomado para a análise cm ³	Volume final da solução corada cm ³	Espessura da cuba usada cm	D	E	k	Mg per 10 cm ³ de sôro mg
0.04	50	1	17	—	0.770	47.93
0.04	50	1	18	—	0.745	46.38
0.05	50	0.5	34	0.468	0.936	46.61
0.05	100	1	34.6	—	0.461	45.91
0.07	100	1	21.5	—	0.668	47.52
0.07	100	1	22	—	0.658	46.81
0.08	100	1	18	—	0.745	46.38
0.08	100	1	17.5	—	0.757	47.12
0.10	100	0.5	34	0.468	0.936	46.61
0.10	100	0.5	33.4	0.463	0.926	46.11
0.15	150	0.5	35	0.456	0.912	45.42
0.20	200	0.5	34	0.468	0.936	46.61

Média	46.62
Erro médio	0.683
Erro padrão	0.197
Coefficiente de variação	1.465%

RESULTADOS

Afim de verificar a reprodutibilidade dos resultados fornecidos pelo método descrito, fizemos no mesmo sôro de *Callinectes danae* Smith, doze determinações, e os números obtidos encontram-se no quadro X.

COMENTÁRIOS SÔBRE O MÉTODO

Os elementos interferentes que mais freqüentemente se encontram nos meios biológicos em quantidades capazes de ocasionar erros aditivos, no caso da determinação do magnésio por meio da 8-hidroxi-quinolina (oxina), são o alumínio, o cobre, o ferro e o cálcio. Os três primeiros podem ser facilmente isolados por meio da oxina acética em meio convenientemente tamponado, e êsse método de separação é, pelo menos em certos casos, preferível ao geralmente usado, que realiza o isolamento dos metais citados por meio do amoníaco, ou do acetato de amônio em solução de *pH* conveniente.

O cálcio se isola sob fórmula de $(COO)_2Ca$. E' de notar-se, porém, que quando a quantidade de magnésio é muito superior à do cálcio, o que não se dá, em geral, nos meios biológicos, aquele póde coprecipitar-se, ou postprecipitar-se. Os resultados obtidos por meio da modificação do método de HIRTH, estudada no presente trabalho, mostram que os erros provenientes dessa fonte podem ser consideravelmente reduzidos.

A oxina é apenas muito levemente solúvel nágua, de sorte que se deve considerar a possibilidade de se originarem erros devidos a êsse fáto.

A adição de excesso considerável de oxina, ao líquido de que se vai precipitar o magnésio, deve ser cuidadosamente evitada, devido à possibilidade de oclusão.

Não é aconselhável usar-se grande excesso de oxalato para a precipitação do cálcio: a turvação que se desenvolve, quando se precipita o magnésio por meio da oxina, é a consequência do emprêgo de quantidades consideravelmente superior às necessárias, de oxalato.

A quantidade de oxina a ajuntar-se depende da quantidade de magnésio presente e da diluição da solução.

A precipitação e a reprodutibilidade dos resultados foram mais satisfatórias quando as quantidades de magnésio, contidas em volume de 5-6 cm³, se situavam entre 20 e 100 microgramas.

SUMMARY

A method for the photometric determination of magnesium based on the precipitation of this element with 8-hydroxyquinoline was studied. A number of interfering ions are precipitated as the

oxinate in a acetic acid-sodium acetate buffered solution. Calcium is separated as the oxalate at pH — 4.5-5.3 and the washed magnesium oxinate is dissolved in hydrochloric acid, coupled with diazotized naphthionic acid to a permanganate colored stuff. The photometric measurements are made with the Zeiss-Pulfrich step-photometer, with the use of filter S-50.

Comments are made on the method.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — TUFTS, E. V. and D. M. GREENBERG — 1938 — The biochemistry of magnesium deficiency. *J. Biol. Chem.*, 122: 693-714, 715-26
- 2 — KLEIBER, M., M. D. D. BEOLTER and D. M. GREENBERG — 1941 — Fasting catabolism and food utilization of magnesium deficient rats. *J. Nut.*, 24: 363-72
- 3 — CANNAVÓ, L. und R. INDOVINA — 1932 — Über den Magnesiumgehalt der Blutkörperchen nach Prolandarreicherung. *Bioch. Zeitschr.*, 250: 405-7
- 4 — DUCKWORTH, J., W. GODDEN and G. M. WARNOCK — 1940 — The effect of acute magnesium deficiency in bone formation in rats. *Bioch. J.*, 34: 97-108
- 5 — DUCKWORTH, J., and W. GODDEN — 1941 — The lability of skeletal magnesium reserves. The influence of rates of bone growth. *Ibid.* 35: 816-23
- 6 — BODANSKY, O — 1936 — The effect of α amino-acids and magnesium on the activity of kidney and intestinal phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 115: 101-10
- 7 — SJOLLEMA, B. — 1930 — On the nature and therapy of grass staggers. *Vet. Rec.*, 10: 425-430; 450-453
- 8 — METZGER, H. J. — 1936 — A case of tetany with hypomagnesia in a dairy cow. *Cornell Vet.*, 26: 353-56
- 9 — MARSHALL, D. — 1938 — Grass staggers and milk fever: preventive measures during flush spring; control of grazing and use of dolomite. *New-Zealand J. Agr.*, 56 (401): 403-8
- 10 — NOLAN, A. F. and F. E. HULL — 1941 — Grass tetany in cattle. *Amer. Jour. Vet. Res.*, 2: 41-5
- 11 — TRUM, B. F. — 1942 — Grass intoxication and tetany. *U. S. Army Vet. Bul.*, 36: 110-116
- 12 — VAZ, Z, R. SALOMÉ PEREIRA e D. M. MALHEIRO — 1945 — Calcium in prevention and treatment of experimental D D T poisoning. *Sci.*, 101: (2626): 434-6
- 13 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1944 — Sobre a composição mineral do sangue do *Callinectes danae* SMITH e sobre a de um líquido para perfusão. *Bol. Fac. Fil. Cien. Let.*, S. Paulo, Zoologia, 8: 147-9
- 14 — SAWAYA, P. — 1944 — Solução perfusora para "Callinectes danae" SMITH. *Ibid.*, 151-61
- 15 — in L. PINCUNSEN — 1929 — Micrométodos. Barcelona, Salvat
- 16 — BRIGGS, A. P. — 1922 — A colorimetric method for the determination of small amounts of magnesium. *J. Biol. Chem.*, 52: 349-55

- 17 — SNELL, F. D. and CORNELIA T. SNELL — 1941 — Colorimetric methods of analysis. New York, D. Van Nostrand Company, Inc.
- 18 — KOLTHOFF, I. M. — 1927 — Eine neue spezifische Farbreaktion auf Magnesium und eine einfache kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Spuren dieses Elements. *Bioch. Zeitschr.*, 185: 344-8
- 19 — BECKA, J. — 1931 — Über die praktische Anwendung der colorimetrischen Magnesiumbestimmung in der Biochemie. *Bioch. Zeitschr.*, 233: 118-128
- 20 — URBACH, C. und R. BARIL — 1934 — Stufenphotometrischer Beitrag zur quantitativen Bestimmung des Magnesiums mittels Titangelb nach Kolthoff. *Mikrochemie*, 14: 343-6
- 21 — HIRSCHFELDER, A. D. E. R. SERLES and V. G. HAURY — 1934 — A simple adaptation of Kolthoff's colorimetric method for the determination of magnesium in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 104: 635-45
- 22 — HAURY, V. G. — 1938 — Modification of the titan yellow method for the determination of small amounts of magnesium in biological fluids. *J. Lab. Clin. Med.*, 23: 1079-84
- 23 — OTTO, E. B. and C. E. OTTO — 1941 — Titan yellow qualitative test for magnesium. *Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.)* 13: 65-6
- 24 — GILLAM, W. S. — 1941 — A photometric method for the determination of magnesium. *Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.)* 13: 499-501
- 25 — GINSBERG, H. — 1940 — *Zeitschr. Elektrochem.* — 45: 829-33. in *Chem. Abstr.*, 34: 1934 (1940)
- 26 — THIEL, A. und E. VAN HENGEL — 1938 — Grundlagen und Anwendungen der Absolutcolorimetrie. Die absolutcolorimetrische Bestimmung des Magnesiums. *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 71: 1157-62
- 27 — HAHN, F. L., H. WOLF und G. JÄGER — 1924 — Ein hochempfindlicher Farbnachweis für Magnesium. *Ber. deuts. chem. Ges.*, 57: 1394-6
- 28 — FEIGL, F. und F. PAVELKA — 1924 — Die Nachweis und die Bestimmung kleinster Mengen von Ca und Mg mit Hilfe von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{CN})_6$, sowie ein neues nephelometrisches Verfahren zur Bestimmung der Härte des Wassers. *Mikrochemie*, 2: 85-91
- 29 — KRISS, L. — 1925 — Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium. *Bioch. Zeitschr.*, 158: 203-204; 162: 359-65
- 30 — RONNA, P. und H. KLEINMANN — 1923 — Eine Methode zur nephelometrischen Bestimmung kleinster Calciummengen. *Bioch. Zeitschr.*, 137: 157-83
- 31 — LANG, K. — 1932 — Eine Mikromethode zur Bestimmung kleinster Mengen Magnesium in biologischem Material. *Bioch. Zeitschr.*, 253: 215-7
- 32 — HAVINGA, E. — BALLOT, A. F. K. B. — 1942 — *Rec. Trav. Chim.* — 61, 849-854 apud. C. A. — 1944 38 (20), 54676
- 33 — BERG, R. — 1938 — Die analytische Verwendung von o — Oxochinolin ("Oxin") und seiner Derivate — Die chemische Analyse, 34 Bd. Stuttgart, Ferdinand Enke
- 34 — YOSHIMATSU, SHUN-ICHI — 1929 — A new rapid method for the determination of magnesium with one cc of blood without preliminary elimination of calcium. *Tohoku J. Exp. Med.*, 14: 39-35
- 35 — EICHHOLZ, F. und R. BERG — 1930 — Magnesiumbestimmung im Blut. *Bioch. Zeitschr.*, 225: 352-7

- 36 — TEITELBAUM, M. — 1930 — Beiträge zur colorimetrischen Mikrobestimmung. Bestimmung von Bismut, Aluminium und Zink. *Z. Anal. Chem.*, **82**: 366-74
- 37 — ALTEN, F., WEILAND, H. e KURMIES, B. — 1933 — Colorimetrische Magnesiumbestimmung. *Z. anal. Chem.*, **46**: 697-98
- 38 — LAVOLLAY, J. — 1935 — Micro et submicro dosage colorimétrique du fer. *Bul. Soc. Chim. Biol.*, **17**: 432-8
- 39 — HOFFMAN, W. S. — 1937 — A colorimetric method for the determination of serum magnesium based on the hydroxyquinoline precipitation. *J. Biol. Chem.*, **118**: 37-45
- 40 — WOLFF, R. — 1938 — Nouvelle technique de microdosage du magnésium dans le serum sanguin par colorimétrie photoélectrique. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **127**: 1445-6
- 41 — SCHAMS, O. — 1938 — Über die mikrokolorimetrische Bestimmung des Aluminiums in Pflanzenaschen. *Mikrochemie*, **25**: 16-46
- 42 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1939 — Sur la détermination spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction céruléo — molybdique de Denigès. *Bul. Soc. Chim. Biol.*, **21**: 827-35
- 43 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1945 — Photometric determination of potassium in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **160**: 617-29