

Vol. 3 — Fasc. 4

Junho de 1948

Departamento de Química Orgânica e Biológica  
Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

Departamento de Zootecnia Geral, Genética Animal e Bromatologia  
Diretor: Prof. Dr. Milton de Souza Piza

NOTAS SÔBRE O EMPRÊGO DO MÉTODO DE  
BENEDICT-THEIS NA DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO  
INORGÂNICO DO SANGUE DOS EQÜINOS,  
PELO ELETRO-FOTÔMETRO DE FISHER (\*)

(NOTES ON THE APPLICABILITY OF THE BENEDICT-THEIS METHOD  
FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS IN EQUINE  
BLOOD BY FISHER'S ELECTROPHOTOMETER)

Virgílio Bonoldi

Fernando Andreasi

Contando o laboratório, entre sua aparelhagem, com o eletrofotômetro de FISHER e, segundo indicações da publicação que acompanha o referido aparelho, prestando-se à determinação do fósforo inorgânico do sangue pelo método de BENEDICT-THEIS, realizamos uma série de dosagens — utilizando sôro de eqüinos — observando as normas geralmente seguidas em trabalhos de tal natureza. O intuito, era indagar do comportamento dêsse método em tal aparelho, e ao mesmo tempo, procurarmos nos inteirar dos pormenores relativos à técnica do mesmo, no particular. As presentes linhas são constituídas, principalmente, pelo relato do que nos foi dado observar.

## PARTE EXPERIMENTAL

Preliminarmente foi feita a determinação do fator numérico para o micro-tubo que acompanha o aparelho, e que no caso foi igual a 0,0406 para o filtro n.º 650 indicado como apropriado. Abstemo-nos de nos deter sôbre o modo de obtenção dêsse fator numérico, já que é de prática corrente, bem como lembrar da necessidade de sua determinação para cada aparelho, em virtude das diferenças que soem apresentar os filtros fornecidos.

## MATERIAL.

Trabalhando com sangue de eqüinos, preparamos um volume de sôro adequado, para assim contarmos com uma amostra suficiente para tôdas as provas.

(\*) Apresentado ao IV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, 22-28/1/1948.

Na obtenção do filtrado, quer no que concerne à precipitação dos prótidos do sôro, quer no que diz respeito à filtragem, seguiram-se as normas e recomendações de KOCH.

Com o filtrado obtido, procedeu-se ao desenvolvimento de côr, segundo a técnica do método de BENEDICT-THEIS. Visando esclarecer da estabilidade de côr desenvolvida, foram efetuadas leituras em espaços de tempos diferentes.

Finalmente, realizou-se a prova de recuperação, utilizando-se para isso uma solução com teor conhecido de fósforo, em quantidades variáveis acrescentadas ao sôro, tomado em volume fixo.

QUADRO I  
Resultados obtidos com dosagens repetidas no mesmo sôro

Tubos	mg de P em 100 cm <sup>3</sup> de sôro	Tubos	mg de P em 100 cm <sup>3</sup> de sôro
1	3,71	7	3,66
2	3,71	8	3,56
3	3,71	9	3,66
4	3,71	10	3,61
5	3,66	11	3,66
6	3,71	12	3,56

QUADRO II

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	3,71	3,35	3,61
2	3,71	3,56	3,82
3	3,71	3,50	3,82
4	3,71	3,46	3,93
5	3,66	3,50	3,77
6	3,71	3,35	3,77
7	3,66	3,46	3,77
8	3,56	3,35	3,71
9	3,66	3,41	3,66
10	3,61	3,31	3,61
11	3,66	3,46	3,82
12	3,56	3,31	3,77

A análise estatística do quadro I revela:

$\bar{V}$ (média)	3,66 mg
$\sigma \pm$ (desvio padrão)	0,054 mg
C. V. (coeficiente de variabilidade)	1,47 %

As determinações do quadro I foram utilizadas para verificarmos se os valores de fósforo encontrados sofriam alterações em função do tempo decorrido após o desenvolvimento da côr.

A interpretação estatística dos resultados do quadro II mostra:

	A	B	C
V (média)	3,66 mg	3,41 mg	3,75 mg
$\sigma \pm$ (desvio padrão)	0,054 mg	0,068 mg	0,090 mg
C. V. (coeficiente de variabilidade)	1,47 %	1,99 %	2,40 %
N (número de determinações)	12	12	12

Constam do quadro a seguir, os dados e os resultados da prova de recuperação.

QUADRO III

Tubos	P no soro em 1 cm <sup>3</sup> (mg)	P adicionado em 1 cm <sup>3</sup> (mg)	mg de P (teórico) em 100 cm	mg de P (encontrados) em 100 cm <sup>3</sup>	Porcentagem de recuperação
1	0,0366	0,0207	2,86	2,72	95,10
2	0,0366	0,0207	2,86	2,67	93,35
3	0,0366	0,0207	2,86	2,67	93,35
4	0,0366	0,0248	3,07	2,88	93,81
5	0,0366	0,0248	3,07	3,01	98,04
6	0,0366	0,0248	3,07	3,05	99,34
7	0,0366	0,0290	3,28	3,23	98,47
8	0,0366	0,0290	3,28	3,23	98,17
9	0,0366	0,0290	3,28	3,05	92,98
10	0,0366	0,0331	3,48	3,37	96,83
11	0,0366	0,0331	3,48	3,37	93,96
12	0,0366	0,0331	3,48	3,42	98,27

## Estudo estatístico aplicado à porcentagem de recuperação:

$$\begin{aligned} \bar{V} &= 96,00 \% \\ \sigma \pm &= 2,35 \text{ mg} \\ \text{C. V.} &= 2,44 \% \end{aligned}$$

A análise estatística aplicada aos resultados consignados no quadro II e relativos aos valores obtidos em função do tempo decorrido após o desenvolvimento da côr, revela o seguinte:

	A com B	A com C	B com C
Valor de T . . . . .	10,04	2,99	10,49
Significância ao nível de 1%	significante	significante	significante

Do que antecede deduz-se que devemos efetuar a leitura logo após o resfriamento que se segue ao desenvolvimento da côr, tal como para a obtenção do fator numérico, porque, com menos de 1% de probabilidade de êrro, as diferenças observadas não podem ser atribuídas ao acaso.

O teste T, aplicado à prova de recuperação, dá-nos o valor de 20,48 significativo a menos de 5% de probabilidade de êrro. Deduz-se, dêsse fato, a existência de fator ou fatores que, não sendo atribuíveis ao acaso, perturbam, sistematicamente, a obtenção de resultados dentro de uma probabilidade de êrro compatível com uma favorável segurança dos resultados.

## DISCUSSÃO

Dentre as recomendações e advertências formuladas pelos autores do método, destacam-se:

I — quando do desenvolvimento da côr, reproduzir cuidadosamente, a cada determinação, tanto o espaço de tempo quanto a temperatura de aquecimento (ebulição) empregados;

II — proceder ao resfriamento sempre nas mesmas condições e em idêntico espaço de tempo;

III — dada a alterabilidade da côr desenvolvida, efetuar as leituras dentro de meia hora após o desenvolvimento da côr.

Ora, tendo sido observados cuidadosamente êsses pontos, quando feitas as determinações, resultando recuperação, como vimos, significativamente afastada de um limite favorável, isto nos leva a afirmar que, — salvo aparelhagem especial fora daquela comum dos laboratórios e que permitiria a preciosa consecussão dos itens formulados, —

o método trabalha menos satisfatoriamente. Não é demais se afirmar que fala a favor destas nossas considerações, ter-se como porcentagem de variabilidade dos valores consignados na interpretação estatística do quadro II, números muito próximos (1,47% ; 1,99% e 2,4%, respectivamente para os tempos "logo após", "6 horas" e "23 horas"), o que provavelmente não ocorreria, se sujeitos os tubos à condições diversas daquelas dos três itens enumerados. Acrescente-se que o valor do coeficiente de variabilidade da prova de recuperação, relativo ao quadro III, foi de 2,44% o que é mais um dado a favor de nossas considerações.

Se imputável não fôr a êsses particulares dos tempos a precariedade do método, caberá a causa então a fator ou fatores atinentes, por exemplo, ao desenvolvimento e estabilidade da côr em si e ao seu preenchimento da lei de LAMBERT-BEER, ressalvada a inteira propriedade do filtro indicado e utilizado.

#### CONCLUSÕES GERAIS

Dentro da extensão e nas condições da experimentação, usando-se o filtro n.º 650, conclui-se que o método de BENEDICT-THEIS na determinação dos fosfatos inorgânicos no sangue de eqüinos, comporta-se no eletro-fotômetro de FISHER:

I — satisfatoriamente quanto à porcentagem de variabilidade dos resultados computados;

II — menos satisfatoriamente quanto à recuperação, significativamente afastada, de acôrdo com o cálculo do teste T dos valores teóricos, pois as diferenças observadas não podem ser atribuídas ao acaso.

Conclui-se, além disso, aplicando o teste T às leituras efetuadas em tempos diversos (logo após, 6 horas e 23 horas decorridas do desenvolvimento da côr):

III — que a leitura deve efetuar-se após o desenvolvimento da côr, tal como foi feito para a obtenção do fator numérico, já que, com menos de 1% de probabilidade de êrro, as diferenças observadas não podem ser atribuídas ao acaso.

#### RESUMO

Os autores, no intuito de indagar do comportamento e familiarizar-se com o particular da técnica no método de BENEDICT-THEIS no eletro-fotômetro de FISHER, método preconizado para a determinação de fosfatos inorgânicos no sangue — utilizando sôro de eqüino — realizaram uma série de dosagens repetidas no mesmo sôro. Em seguida, procederam à prova de recuperação, juntando quantidades diferentes de solução de fosfato a volume fixo do mesmo sôro, observado o cri-

tério geralmente seguido em trabalhos de tal natureza. Dos dados das determinações e nas condições em que as mesmas foram realizadas, concluíram que há necessidade de efetuar-se a leitura logo após o desenvolvimento da côr em tempos tais como para a obtenção do fator numérico. Verificaram que o método comporta-se satisfatoriamente, quanto à porcentagem de variabilidade, porém, não quanto à prova de recuperação, pois a mesma, de acôrdo com o teste T está significativamente afastada dos valores teóricos. Aventam a hipótese de que tal recuperação falha, ou em razão de cuidados necessários a ter-se quanto ao tempo relativo ao desenvolvimento da côr e o posterior resfriamento, ou em consequência de fator ou fatores que dizem respeito à plena satisfação da lei de LAMBERT-BEER por parte do método.

#### ABSTRACT

*With the purpose of both traces the behaviour and to get acquainted with the particular technic of the Benedict-Theis method in the Fisher's electro-photometer, method preconized for the determination of inorganic phosphates in the blood, the AA., employing equine serum, made a series of determinations repeated in the same serum. After this they proceeded with the recovery test, adding different amounts of the phosphate solution to equal volume of the same serum, following the criterion generally adopted in such works. From the determinations obtained under the conditions in which they were performed, the AA. concluded that there is necessity of taking the readings soon after the color development, observing closely the procedure indicated to find the calibration factor. It was stated that the method answers satisfactory against the coefficient of variability, but, negatively to the recovery test, because according to T-test estimation, the results differ from the theoric ones with significance. They raise the supposition that the recovery fails due to the cautions demanded relatively to the time of color development and posterior cooling or in consequence of one or various factors concerning the agreement of the method in Lambert-Beer's law.*

#### BIBLIOGRAFIA

- BENEDICT, S. R. — THEIS, R. C. — 1924 — A modification of the molybdc method for the determination of inorganic phosphorus in serum. *J. Biol. Chem.*, 61: 63
- Fisher Scientific Co. — 1941 — A manual of colorimetric analysis with the Ac model Fisher Electrophotometer. New York, Eimer and Amend
- KOCH, F. C. — 1941 — Practical methods in Biochemistry. 3 ed.: 162-3. Baltimore, Williams & Wilkins Company