

A. R. A. Nogueira; G. B. Souza; L. A. R. Batista
 Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste - EMBRAPA - CP 339 - 13560-970 - S. C.

Recebido em 19/4/95; aceito em 10/8/95

PROCI-1996.00016
 NOG
 1996
 SP-1996.00016

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF NITROGEN IN PLANTS DIGESTED BY FLOW INJECTION SYSTEM ANALYSIS. A spectrophotometric flow injection methodology was adjusted to a routine nitrogen determination in plants and feeds as the sulfuric acid digestion employing salicylic acid in the indophenol blue formation. The use of phenol as colorimetric reagent was avoided and the resulting solutions can be discarded without previous treatment. The achieved results showed linearity until 100.0 mg N l⁻¹ with detection limit of 0.37 mg N l⁻¹. The proposed method is suitable for 90 - 100 measurements per hour, uses only 50 µl of sample and 5.0 mg of reagent per analysis with relative standard deviation of 0.9% and 0.4% for typical samples (23.4 and 29.3 mg N l⁻¹). Results for total nitrogen in plant tissues and animal feeds are in good agreement ($p < 0.01$) with those obtained by the usual distillation/titration method.

Keywords: nitrogen; flow injection analysis; protein.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento na formulação de rações tem provocado um grande aumento na necessidade de controle dos nutrientes envolvidos, entre eles a proteína, que é um dos componentes básicos na alimentação animal¹. Sua quantificação é importante na formulação das rações para um ótimo desempenho animal, sendo normalmente calculada a partir do conteúdo total de nitrogênio nos alimentos pelo método de destilação e análise Kjeldahl e em seguida multiplicando-se o valor encontrado por um fator que converte o teor de nitrogênio total em teor de proteína². O nitrogênio total também é determinado em digeridos animais, plantas, solos, etc., por ser um dos elementos essenciais para o crescimento da planta e representar um dos nutrientes comumente aplicados ao solo como fertilizante³. Em função disso, a determinação de nitrogênio, como um parâmetro para se medir proteína em alimentos e fluidos animais é de interesse de diversos laboratórios de pesquisa, de controle ou industriais, sendo freqüente a necessidade de um grande número de análises.

O mais específico e sensível procedimento espectrofotométrico para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal em fluidos biológicos, águas naturais e domésticas e extratos de solos, baseia-se na formação de uma intensa coloração do azul de indofenol entre amônio e compostos fenólicos em presença de um agente oxidante como hipoclorito, primeiramente publicado por Berthelot em 1859⁴, sendo a literatura relacionada a esta reação bastante extensa^{4,5,6,7}. O composto fenólico normalmente utilizado é o fenol que, dependendo das condições da reação, pode resultar em compostos tóxicos e voláteis de o-clorofenol. O mecanismo de reação é complexo e a sensibilidade da reação é dependente do pH, da temperatura e da ordem de adição e concentração de reagentes.

Em análise por injeção em fluxo, todos os parâmetros envolvidos na reação podem ser facilmente controlados⁸. A determinação espectrofotométrica de nitrogênio amoniacal por injeção em fluxo em amostras de águas com baixas concentrações foi estudada por diversos autores, utilizando-se técnicas de pré-concentração e reação de Nessler^{9,10} usando-se a reação de Berthelot com fenol¹¹ e salicilato¹². Em digeridos com ácido sulfúrico foi determinado em amostras de carne e derivados¹³

e em plantas⁵, sendo também empregada técnica de difusão gasosa e condutimetria¹⁴.

Apesar da metodologia baseada na reação de Berthelot ser largamente utilizada, sendo um dos primeiros métodos adaptados em análise por injeção em fluxo⁴, seu mecanismo ainda é controverso, com os procedimentos descritos diferindo quanto à ordem de adição dos reagentes, natureza dos agentes complexantes, concentração, temperatura, pH, etc.

O objetivo deste trabalho foi empregar a metodologia de análise por injeção em fluxo em digeridos de plantas¹⁵ baseando-se no método oficial da AOAC¹⁶. O ácido salicílico foi empregado para formar o azul de indofenol¹⁷. A determinação automatizada de proteína em alimentação animal vem a proporcionar ganho de tempo e redução no consumo de amostras e reagentes, contribuindo para o aumento na eficiência dos laboratórios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamentos

Bomba peristáltica (Technicon II) suprida com tubos Tygon com diferentes diâmetros internos, foi empregada para o bombeamento das soluções. O sistema empregou tubos de polietileno (0,7 mm d.i.), e o injetor/comutador foi confeccionado em acrílico. Banho termostatizado (FANEM, mod 100) foi incorporado ao sistema para controle da temperatura. Espectrofotômetro VIS (FEMTO, mod 432), equipado com célula de fluxo contínuo (10 mm de caminho ótico, 80µl), foi utilizado para detecção, conectado a registrador potenciométrico (INTRALAB mod. 1200) para as medidas dos sinais. As determinações foram feitas em comprimento de onda (λ) igual a 660 nm.

Amostras, Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes químicos *pro analysi*, exceto o hipoclorito (produto comercial). Água destilada-desionizada foi empregada para o preparo das soluções e padrões.

Ácido sulfúrico, H₂SO₄ ca 1,2 M (15,0 ml H₂SO₄ conc. 1⁻¹), empregado como fluxo transportador (C).

Hidróxido de sódio 0,75 M NaOH (R₁).

Solução de ácido salicílico/nitroprussiato (R_2), foi preparada em meio hidróxido de sódio (0,35 M NaOH) contendo citrato de sódio 5% ($m v^{-1}$) para se evitarem precipitações de hidróxidos de metais¹⁶ e nitroprussiato 0,50% ($m v^{-1}$) como agente que catalisa a velocidade de formação do cromóforo⁴. As concentrações testadas para o ácido salicílico foram 0,1 e 0,2 M.

Solução comercial de hipoclorito de sódio, contendo 2,0 - 2,5% de cloro ativo (R_3).

Os materiais vegetais utilizados foram amostras de *Paspalum* spp, *Avena sativa*, *Sorgum bicolor* (sorgo) e *Saccharum officinarum* (cana de açúcar), obtidas de experimentos de campo no CPPSE (S. Carlos, SP); materiais de referência pertencentes ao programa interlaboratorial de controle de qualidade de análises¹⁸; e amostras provenientes de experimentos em nutrição animal. Todos os materiais foram secos a 65°C por 48h e moídos em peneira de 0,5 mm em moinho tipo Willye. As amostras foram então pesadas em duplicata (200 mg) em tubos de digestão de 100 ml de capacidade. Receberam 0,7 g de mistura catalisadora ($K_2SO_4 + CuSO_4$; 10:1) e 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado, com aquecimento brando até o início da reação, quando o aquecimento foi elevado até ter início o refluxo do ácido sulfúrico (350°C). Quando todos os traços de coloração amarela desapareceram, a digestão prosseguiu por mais 20 min. O tempo total de digestão foi de cerca de 2,5 h. As soluções foram então resfriadas, transferidas para balão volumétrico de 100 ml de capacidade e o volume completado com água¹⁵.

Soluções-padrão de trabalho compreendendo 5,0 - 100,0 mg N l⁻¹ foram preparadas a partir de diluições de uma solução estoque de 1000 mg N l⁻¹ (4,716 g $(NH_4)_2SO_4$ em 1000 ml de água). Para prevenir diferenças entre os tempos e temperaturas durante a digestão, as soluções-padrão foram preparadas seguindo-se o mesmo procedimento das amostras. Foram adicionados 0,0 (branco); 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 ml da solução estoque de 1000 mg N l⁻¹ em tubos de digestão, sendo em seguida adicionada a mistura catalisadora, 2,5 ml de H_2SO_4 e digerindo-se em bloco digestor juntamente com cada lote de amostras.

Diagrama de Fluxos

O diagrama de fluxos utilizado está descrito na figura 1. A amostra (A) é aspirada para preencher a alça de amostragem ($L = 10$ cm, 50 μ l), que define o volume exato de amostra a ser introduzida no sistema, sendo o excesso descartado (D). A porção selecionada é introduzida no fluxo transportador (C, 2,0 ml min⁻¹), atravessa a bobina B_1 (30 cm) para uma perfeita homogeneização, recebe NaOH (R_1 , 4,0 ml min⁻¹), o reagente ácido salicílico/nitroprussiato (R_2 , 0,6 ml min⁻¹), o hipoclorito (R_3 , 0,4 ml min⁻¹) e, após passar pela bobina de reação (B_2 , 300 cm, 37°C), a amostra processada atinge a célula de fluxo ($\lambda = 660$ nm), apresentando um sinal proporcional ao conteúdo total de nitrogênio na amostra, sendo em seguida descartada (D).

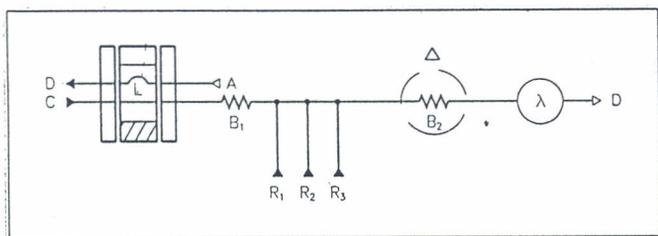


Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema proposto. A, amostra; C, fluxo transportador, H_2SO_4 1,2 M (2,0 ml min⁻¹); L, alça de amostragem (10 cm, ca 50 μ l); R_1 , NaOH, 0,75 M (4,0 ml min⁻¹); R_2 , 0,1 M ácido salicílico + 0,35 M NaOH + 5% citrato de sódio + 0,50% nitroprussiato (0,6 ml min⁻¹); R_3 , NaOCl comercial, 2,0 - 2,5% de cloro ativo (0,4 ml min⁻¹); B_1 , 30cm; B_2 , 300cm, Δ , banho termostático, 37°C; $\lambda = 660$ nm; D, descarte.

O procedimento de destilação e titulação utilizado para comparação dos resultados foi baseado na destilação da amônia e recepção em excesso de ácido bórico, com posterior titulação do borato formado¹⁵.

Para o dimensionamento do sistema, a partir de uma temperatura fixa de 37°C, foi estudada a solução fosfato/tartarato em pH 14, conforme descrito na metodologia da AOAC¹⁶ e diferentes concentrações de NaOH (2,0; 1,5 e 0,75 M NaOH) para o estabelecimento das melhores condições de reação. Foram levantadas curvas padrão para cada um desses valores de pH para concentrações de nitrogênio variando entre 10,0 e 100,0 mg l⁻¹. A concentração do ácido sulfúrico na digestão também variou (2,0; 1,8; 1,2 e 0,6M H_2SO_4). O mesmo procedimento foi desenvolvido após as concentrações de NaOH e H_2SO_4 serem estabelecidas, para a definição da concentração de ácido salicílico (0,1 e 0,2 M). A concentração ideal do fluxo transportador foi determinada a partir da média das concentrações das soluções obtidas após a digestão de 24 amostras, nas quais foram incluídos branco, padrões, amostras com altos teores de matéria orgânica (turfa) e tempo de digestão variando entre 2,00 - 3,00 h.

O efeito da intensidade dos fluxos e da presença dos íons interferentes também foi verificado. Concentrações de metais maiores do que aqueles usualmente encontrados nas plantas foram investigadas separadamente (100,0 mg Mg l⁻¹, 50,0 mg Mn l⁻¹, 50,0 mg Fe l⁻¹, 50,0 mg Al l⁻¹ e 50,0 mg Si l⁻¹, como cloretos, 200,0 mg Ca l⁻¹, como nitrato, 200,0 mg Cu l⁻¹ e 200,0 mg K l⁻¹, como sulfatos).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O emprego da solução fosfato/tartarato em pH 14¹⁶ resultou em precipitação nas linhas de fluxo e elevação na linha base, razão pela qual este tampão foi descartado, optando-se pelo emprego de solução de NaOH.

Estudos envolvendo diferentes vazões do carregador (1,0 e 2,0 ml min⁻¹) e diferentes concentrações de H_2SO_4 e de NaOH, apresentaram aumentos na sensibilidade em valores de pH próximos a 13,0, em todas as combinações estudadas. Vários autores têm considerado que quando nitroprussiato é empregado para catalisar a reação, a máxima formação do indofenol ocorre em valores de pH superiores a 11,5⁵. A presença de nitroprussiato aumentaria a estabilidade da monocloramina, possibilitando a formação do indofenol em velocidades superiores e em valores de pH mais elevados do que aqueles normalmente empregados⁶. Esta teoria é suportada pelo fato de que em métodos que não empregam o nitroprussiato, valores ótimos de pH são encontrados entre 8,5 e 11,5^{19,6}. A presença do nitroprussiato tornaria a reação menos dependente do pH⁴. No entanto, pode-se observar estreita dependência entre valores de pH e velocidade de reação. Os valores de pH com as concentrações de ácido e base estudadas variaram entre 11,80 < pH < 13,27, apresentando máximo sinal analítico em pH próximo a 13,0.

A média de concentração ácida obtida após digestão de 24 amostras e padrões foi de 1,14 M, sendo então empregado como fluxo transportador 1,2 M H_2SO_4 . A concentração final de NaOH que melhor se adaptava às condições da reação deveria neutralizar o carregador e elevar o pH para ca 13,0. A concentração escolhida foi então 0,75 M (4,0 ml min⁻¹). Deve-se salientar que concentrações maiores podem vir a provocar aumento na tensão dos tubos bombeadores de solução, aumentando a complexidade do sistema.

Fixando-se as concentrações do carregador e de NaOH, foi possível se estudar a influência da concentração do salicilato. Não foram observadas grandes diferenças quando a concentração do reagente foi duplicada, pelo contrário, ocorreu uma diminuição no coeficiente angular da curva. A concentração de ácido salicílico foi então fixada como 0,1 M. Resultados similares foram obtidos por outros autores^{4,12}, que também

observaram decréscimos em absorbância com altas concentrações de ácido salicílico.

A diminuição da bobina de reação de 300 para 200 cm provocou diminuição no sinal analítico em mais de 70%. A concentração de 20 mg N l⁻¹, com bobina de 300 cm, apresentou 0,189 A, enquanto que com a bobina de 200 cm o sinal diminuiu para 0,059 A. Em concentração de nitrogênio igual a 60 mg l⁻¹, os resultados foram, respectivamente, 0,514 e 0,092 A, indicando como necessário este tempo para o desenvolvimento da reação nestas condições de temperatura e concentração de reagentes.

A concentração de nitruoprussiato foi fixada em 0,5% m v⁻¹. A solução foi preparada em meio NaOH, com citrato de sódio empregado como mascarante, vindo a permitir a simplificação do sistema com o uso de somente dois canais em confluência. Quando estocada em refrigerador e protegida da luz, esta solução pode ser utilizada durante um período de até cinco dias.

O emprego de 5% m v⁻¹ de citrato de sódio foi eficiente para eliminar interferências de ferro, cálcio e magnésio, sendo preferível ao tartarato, que provocou precipitações e aumentos no sinal em branco. Cobre apresentou diminuição do sinal analítico quando em quantidades superiores a 50 mg l⁻¹. Os teores de cobre nestas amostras são bastante elevados, pois foram adicionados cerca de 25 mg Cu durante a digestão, como catalisador da reação. Com as soluções-padrão preparadas da mesma maneira que as amostras e portanto recebendo as mesmas quantidades de catalisador, esse efeito foi nivelado.

A concentração de cloro ativo, apesar de exercer forte efeito na formação do complexo azul de indofenol, apresentou resultados satisfatórios com o emprego de solução comercial de hipoclorito de sódio contendo entre 2,0 - 2,5% em cloro ativo. Menores concentrações não permitiram que a reação apresentasse sinais mensuráveis no tempo fixado pelas vazões. Para facilidade, e como em sistemas de fluxos todos os parâmetros são controlados, optou-se pela utilização da solução comercial de cloro ativo, independente de sua padronização. Após a abertura do frasco, este foi mantido em refrigerador e protegido de luz.

O sistema proposto tem-se mostrado bastante estável, não apresentando diferenças na linha base e pequenas variações na sensibilidade (< 2 %) após períodos de 4 h de trabalho conforme pode ser observado na figura 2, que apresenta um gráfico de rotina com amostras de sorgo e farelo de soja. A tabela 1 apresenta alguns resultados obtidos a partir da comparação entre a metodologia proposta e o método Kjeldahl. Resultados para oito amostras enviadas ao controle interlaboratorial de plantas apresentaram-se dentro do desvio padrão obtido quando da comparação dos resultados de 48 laboratórios, que empregam diferentes técnicas de determinação¹⁸.

A grande maioria dos laboratórios de nutrição animal ainda emprega o clássico procedimento Kjeldahl, com destilação/titulação. Apesar de muito preciso, este procedimento consome muito tempo. O procedimento proposto tem se mostrado tão eficaz quanto o método titulométrico. Seu sistema é simples, empregando NaOH, que é estável e barato para a elevação do pH; a solução de reagente é composta com o mascarante, economizando assim um canal e diminuindo a diluição do sistema; o hipoclorito utilizado é comercial, facilitando o emprego em laboratórios de rotina. Salicilato pode ser empregado no lugar do fenol com bons resultados e tem apresentado a vantagem de ser menos tóxico, sendo que o objetivo final deste trabalho, que foi o de estabelecer condições favoráveis para a determinação de nitrogênio em amostras típicas de um laboratório de nutrição animal foi alcançado.

Seguindo-se as condições descritas anteriormente, a lei de Beer foi seguida em uma faixa de concentração de 0,0 a 100,0 mg N l⁻¹. O coeficiente de correlação foi r² = 0,9998, sendo que a variação da absorbância com a concentração de nitrogênio pode ser descrita pela seguinte equação: A = 0,008 C_{nitrogênio} + 0,02, com limite de detecção (3 vezes o desvio padrão do

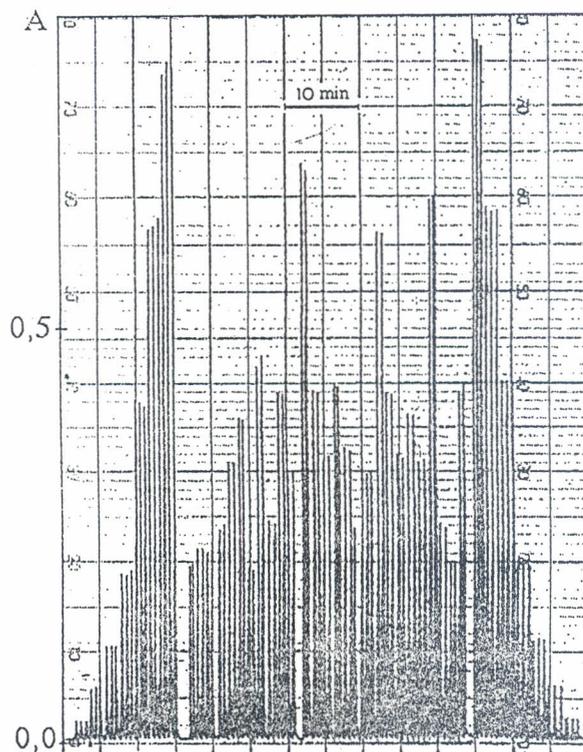


Figura 2. Gráfico obtido em trabalho de rotina, referente a amostras de sorgo e farelo de soja. A partir da esquerda, em triplicata, branco, 5,0; 10,0; 20,0; 40,0, 60,0 e 80,0 mg N l⁻¹, (equivalente a 0 - 4,0 % N na matéria seca); 27 amostras, em duplicata; 80,0; 60,0; 40,0; 20,0; 10,0, 5,0 e branco, em triplicata.

Tabela 1. Teores de nitrogênio em amostras de *paspalum* spp. Determinados pelo sistema proposto (FIA^a) e por destilação (Kjeldahl). Dados expressos em gramas de nitrogênio por kilograma de matéria seca (g kg⁻¹). Números entre parênteses representam a estimativa do desvio padrão expressa em % (n=3).

Amostra	FIA	Kjeldahl
1	9,5 (0,7)	10,1 (1,2)
2	8,8 (0,5)	9,1 (0,8)
3	11,4 (0,3)	11,6 (1,4)
4	10,9 (1,5)	11,1 (1,1)
5	11,9 (0,6)	11,0 (1,3)
6	12,2 (1,1)	12,4 (0,5)
7	7,9 (0,8)	8,2 (2,1)
8	7,6 (0,1)	7,5 (1,6)
9	8,1 (0,5)	8,1 (1,0)
10	8,6 (0,9)	8,7 (1,3)
11	7,2 (0,8)	6,8 (1,9)
12	13,9 (1,0)	13,8 (0,7)
13	6,7 (0,6)	6,7 (0,9)
14	6,5 (0,8)	6,4 (1,3)

a. Do inglês " Flow Injection Analysis"

branco dividido pelo coeficiente angular) de 0,37 mg N l⁻¹. Os desvios padrão relativos a 10 injeções sucessivas de uma amostra com 23,4 mg N l⁻¹ e outra contendo 29,65 mg N l⁻¹ de nitrogênio foram de 0,9% e 0,4% respectivamente. Os resultados para nitrogênio total em materiais vegetais e alimentos animais obtidos por este método apresentaram boa concordância (Tukey, p < 0,01) com aqueles obtidos com o método usual de destilação/titulação, sendo que a correlação entre os dois métodos foi r² = 0,998, y = 1,003x + 0,02, após 160 determinações

CONCLUSÕES

Nitrogênio em forragens e alimentos animais pode ser determinado espectrofotometricamente por análise em injeção em fluxo baseado na formação do azul de indofenol com o uso de ácido salicílico. A utilização do fenol como reagente colorimétrico foi evitada e a solução resultante pode ser descartada sem tratamento prévio.

Esta metodologia encontra-se em aplicação no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste - CPPSE, EMBRAPA, tendo sido até o momento realizadas mais de 3000 determinações.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, EMBRAPA e CNPq pelo auxílio financeiro, aos colegas L. A. C. Jorge e R. Godoy pela digitalização das figuras e C. H. Garcia pela assistência técnica no laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Van Staden, J. F.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1983, 66, 718.
2. Hamblenton, L. G.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1977, 60, 845.
3. Williams, C. H.; Twine, J. R.; *Determination of Nitrogen, Sulphur, Phosphorus, Potassium, Sodium, Calcium, and Magnesium in Plant Material by Automatic Analysis*. Commonwealth Sci. and Ind. Res. Organization, Australia.
6. Krom, M.D.; *Analyst* 1980, 105, 305.
7. Weatherburn, M. W.; *Anal. Chem.* 1967, 39, 97.
8. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Flow Injection Analysis*, 2nd edn., Wiley-Interscience, New York 1988.
9. Bergamin Fo, H.; Reis, B. F.; Jacintho, A. O.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* 1980, 117, 81.
10. Santos F^a, M. M.; B. F. Reis; Bergamin F^o, H.; Baccan, N.; *Anal. Chim. Acta* 1992, 261, 339.
11. Krug, F. J.; Reis, B. F.; Giné, M. F.; Zagatto, E. A. G.; Ferreira, J. R.; Jacintho, A. O.; *Anal. Chim. Acta* 1983, 151, 39.
12. Nóbrega, J. A.; Mozeto, A. A.; Alberici, R. M.; Guimaraes, J. L.; *J. Braz. Chem. Soc.*, in press.
13. Rocha, J. C.; Graner, C. A. F.; Magnani, R.; *Ecl. Quím.* 1988, 13, 71.
14. Pasquini, C.; Faria, L. C.; *Anal. Chim. Acta* 1987, 193, 19.
15. Silva, D. J.; *Análise de Alimentos - Métodos Químicos e Biológicos* - Ed. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG 1981.
16. A. O. A. C.; *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. 15^a Ed., v.1, Washington 1990.
17. Kempers, A. J.; Kok, C. J.; *Anal. Chim. Acta* 1989, 221, 147.
18. Vitti, G. C.; Pereira, H. S., Percin, D.; Prochnow, L. I. *B. Inf. da SBCCS*, Campinas 1994, 19, 114.
19. Patton, C. H. J.; Crouch, S. R.; *Anal. Chem.* 1977, 49, 464.

Publicação financiada pela FAPESP