



AULA PRÁTICA Nº - 07  
28 / Abril / 2016  
Profª Solange Brazaca

## DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO

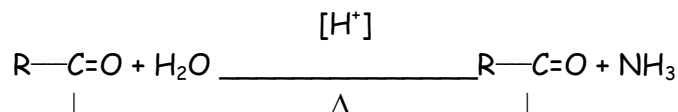
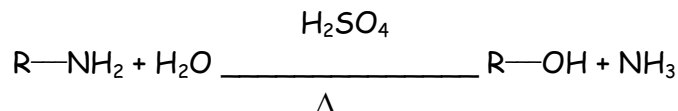
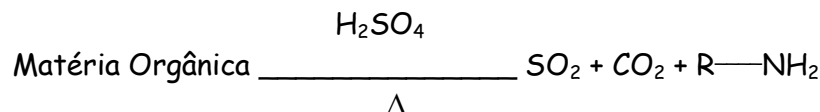
### FUNDAMENTO:

A determinação do nitrogênio total (NT) proposta por Kjeldahl em 1883, ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações (Vogel, 1992). Esta técnica possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional (Yasuhara e Nokihara, 2001; Nogueira e Souza, 2005).

O método é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 350° C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído (Nogueira e Souza, 2005).

As reações químicas que se passam durante o processo da determinação dos compostos nitrogenados podem ser assim resumidas:

### DIGESTÃO:





DEPARTAMENTO DE AGROINDÚSTRIA, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO - ESALQ/USP  
LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



O Carbono contido na matéria orgânica é oxidado e o dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) se desprende.

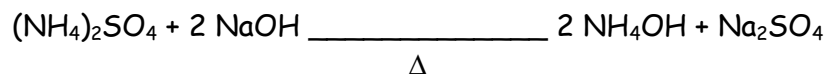
Durante o processo da digestão a solução passa de uma coloração escura (preto) para verde ou azul claro. Além dos agrupamentos proteicos, existe o nitrogênio sob a forma de amina, amida e nitrila, que é transformado em amônia ( $\text{NH}_3$ ) a qual reage com o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , formando o sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Quando resfriado, o sulfato de amônio forma cristais, que ficam depositados no fundo do tubo de digestão.

Após resfriamento, inicia-se o processo de destilação, que pode ser feito por aquecimento direto ou por arraste de vapor.

O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio em excesso, ocorrendo a liberação da amônia, conforme as reações:

#### DESTILAÇÃO:



$\Delta$



$\Delta$

A amônia que desprende na reação é coletada num frasco contendo ácido bórico juntamente com um indicador.

A solução contendo o ácido bórico com o indicador que no início do processo apresenta coloração rósea adquire a coloração esverdeada, a medida que o ácido bórico vai passando para borato de amônio.





A última etapa do processo corresponde a titulação. O borato de amônio formado é titulado com uma solução padronizada de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico de título conhecido até a viragem da coloração verde para cinza.

#### TITULAÇÃO:



#### ESCOPO:

Essa prática tem como objetivo determinar o teor de Nitrogênio e conseqüentemente o teor de Proteínas, pelo método de Kjeldahl, em amostras de alimentos em geral, exceto óleos e gorduras.

Nesta atividade experimental temos como objetivo a determinação de proteínas em amostras de arroz.

#### EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

- ◆ Agitador magnético
- ◆ Balança analítica
- ◆ Bloco digestor
- ◆ Capela com exaustão de gases
- ◆ Destilador Kjeldhal

#### VIDRARIAS UTILIZADAS:

- ◆ Becker 100, 250, 1000 e 2000 mL
- ◆ Balão Volumétrico 100, 250 e 1000 mL
- ◆ Bureta 25 mL
- ◆ Erlenmeyer 125 mL
- ◆ Conta-gotas
- ◆ Espátula
- ◆ Proveta 50 mL
- ◆ Tubos para Nitrogênio



## REAGENTES UTILIZADOS:

- ◆ Álcool Etílico p.a
- ◆ Solução de ácido Sulfúrico 0,02N
- ◆ Solução digestora
- ◆ Solução de hidróxido de Sódio 11N
- ◆ Solução de ácido Bórico 2%
- ◆ Indicador de Vermelho de Metila + Verde de Bromocresol

## PROCEDIMENTO:

### DIGESTÃO:

- ◆ Identificar os tubos de digestão de Nitrogênio;
- ◆ Pesar em balança analítica, 0,1g de amostra em tubo de digestão de Nitrogênio;
- ◆ Adicionar ao tubo, cuidadosamente, 5 mL de solução digestora;
- ◆ Colocar o tubo de digestão de Nitrogênio no bloco digestor desligado na capela;
- ◆ Deixar os tubos uma noite em repouso, sem aquecimento;
- ◆ No dia seguinte, proceder a digestão das amostras, aumentando a temperatura do bloco digestor de 50 em 50°C até o bloco atingir a temperatura de 350°C, sendo que de 50 para 100°C deixar 1 hora, e as demais subir de 30 em 30 minutos após atingir a temperatura desejada;
- ◆ Deixar no bloco digestor até a queima total da amostra (mudança da cor preto para azulada a branca);
- ◆ Quando dessa cor, deixar no bloco por mais 1:30 hora;
- ◆ Após este tempo, retirar as amostras do bloco e deixar esfriar;
- ◆ Proceder a destilação da amostra.
- ◆ Prepara paralelamente uma "Prova em Branco" como descrito acima, exceto a adição da amostra.

### DESTILAÇÃO:

- ◆ Transferir 5 mL de solução de ácido Bórico a 2% para erlenmeyer de 125 mL;



- ◆ Adicionar 3 gotas do indicador de Vermelho de Metila + Verde de Bromocresol;
- ◆ Homogeneizar o Erlenmeyer;
- ◆ Colocar o Erlenmeyer junto à saída do condensador do destilador de Kjeldhal, de modo que a saída do condensador fique imersa na solução de ácido Bórico para evitar a perda de Amônia;
- ◆ Acoplar o tubo digestor com a amostra na extremidade do destilador de Kjeldhal (mangueira branca);
- ◆ Adicionar 15 mL de solução de hidróxido de Sódio 11N no copo receptor do destilador de Kjeldhal;
- ◆ Abrir a torneira cuidadosamente para que a solução de hidróxido de Sódio escorra para o tubo de digestão contendo a amostra;
- ◆ Lavar, com o auxílio de uma pisseta, as paredes internas do copo receptor com água destilada;
- ◆ Fechar a torneira do copo receptor;
- ◆ Ligar o aquecimento do destilador de Kjeldhal e proceder a destilação, coletando o destilado no Erlenmeyer com ácido Bórico até 50 mL;
- ◆ Abaixar o Erlenmeyer, deixar escorrer livremente o condensado;
- ◆ Desligar o destilador de Kjeldhal;
- ◆ Retirar o Erlenmeyer e levar para titulação com ácido sulfúrico 0,02N.
- ◆ Proceder do mesmo modo com a "Prova em Branco"

#### TITULAÇÃO:

- ◆ Completar o volume da bureta com a solução de ácido Sulfúrico 0,02 N;
- ◆ Colocar o Erlenmeyer com a amostra sobre o agitador magnético e colocar um ímã dentro deste;
- ◆ Agitar vagarosamente;
- ◆ Titular com o ácido Sulfúrico 0,02N contido na bureta, até viragem da cor verde para rósea;
- ◆ Anotar o volume gasto na bureta.
- ◆ Usar o valor do volume gasto na bureta para o calculo de Proteínas.
- ◆ Proceder do mesmo modo com a "Prova em Branco"



## **CÁLCULO:**

### **Nitrogênio:**

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{(VA - VB) \times N \times 14 \times 100}{P}$$

VA = Volume ácido Sulfúrico gasto na titulação da amostra - mL

VB = Volume ácido Sulfúrico gasto na titulação do branco - mL

N = Normalidade do ácido Sulfúrico usado na titulação

14 = Peso molecular do Nitrogênio

P = Peso de amostra levado para a digestão - mg

### **Proteína:**

$$\% \text{ Proteína} = N \times F$$

F = Fator de conversão de Nitrogênio em Proteína = 6,25 - Fator de conversão de Nitrogênio em Proteína para a maioria dos alimentos.

N = % Nitrogênio

## **RESÍDUOS:**

Resíduo proveniente da destilação deverá ser estocado em bombona de 5 litros e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para tratamento de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.

CÓDIGO DO RESÍDUO: R 021 - Resíduo da Destilação de Nitrogênio e listar os reagentes utilizados.

Resíduo proveniente da titulação deverá ser estocado em bombona de 5 litros e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e



armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para tratamento de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.  
CÓDIGO DO RESÍDUO: R 021 - Resíduo da Titulação de Nitrogênio e listar os reagentes utilizados.

**BIBLIOGRAFIA:**

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed. Washington: AOAC, 1995. 2v.



## PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO

### SOLUÇÃO DIGESTORA:

#### Composição Química:

- ◆ Ácido Sulfúrico -  $H_2SO_4$  - CAS [7664-93-9]
  - ◆ Selenito de Sódio Anidro -  $Na_2SeO_3$  - CAS [26970-82-1]
  - ◆ Sulfato de Cobre Pentahidratado -  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  - CAS [7758-99-8]
  - ◆ Sulfato de Sódio Anidro -  $Na_2SO_4$  - CAS [7757-82-6]
  - ◆ Água Destilada
- 
- ◆ Pesar, em balança analítica, 13,6g de Selenito de Sódio;
  - ◆ Pesar, em balança analítica, 20g de Sulfato de Cobre;
  - ◆ Pesar, em balança analítica, 106,9g de Sulfato de Sódio;
  - ◆ Transferir para um Becker de 2000 mL de capacidade, exatamente 875 ml de água destilada;
  - ◆ Levar o Becker para capela com exaustão de gases e em banho de gelo;
  - ◆ Adicionar ao becker, lentamente e sob agitação constante, o Selenito de Sódio, o Sulfato de Cobre e o Sulfato de Sódio;
  - ◆ Solubilizar bem;
  - ◆ Adicionar, sob agitação constante e lentamente 1 litro de ácido Sulfúrico concentrado;
  - ◆ Homogeneizar bem;
  - ◆ Deixar em repouso em capela até esfriar completamente;
  - ◆ Após esfriar, armazenar esta solução em frasco escuro, com tampa rosqueável.





## SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 11N

### Composição Química:

- ◆ Hidróxido de Sódio - NaOH - CAS [1310-73-2]
- ◆ Água Destilada
  
- ◆ Pesar, em balança de precisão, 440 g de hidróxido de Sódio, em becker de 1000 mL de capacidade;
- ◆ Levar o becker para banho e água fria, em capela;
- ◆ Adicionar lenta e cuidadosamente, 300 mL de água destilada recentemente fervida e resfriada;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, lavando o becker com pequena porção de água destilada com o auxílio de uma piceta;
- ◆ Elevar o volume do balão *próximo* à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Deixar em repouso até esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco de polietileno.

## SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 0,02N

Á partir de uma solução de ácido Sulfúrico 1N

### Composição Química

- ◆ Ácido Sulfúrico - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - CAS [7664-93-9]
- ◆ Água Destilada



### **Solução de ácido Sulfúrico 1N**

- ◆ Transferir cuidadosamente em capela e com o auxílio de uma bureta, 7 mL de ácido Sulfúrico p.a. para balão volumétrico de 250 mL de capacidade, já contendo cerca de 200 mL de água destilada;
- ◆ Homogeneizar vagarosamente com movimentos rotatórios;
- ◆ Elevar o volume do balão *próximo* à marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Deixar em repouso até esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco âmbar.

### **Solução de ácido Sulfúrico 0,02N**

- ◆ Transferir cuidadosamente e com o auxílio de uma bureta, 20 mL da solução de ácido Sulfúrico 1N para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, já contendo cerca de 500 mL de água destilada;
- ◆ Agitar vagarosamente com movimentos rotatórios;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco escuro.

Á partir de uma solução de ácido Sulfúrico 0,5N

### **Composição Química**

- ◆ Ácido Sulfúrico 0,5N -  $H_2SO_4$  - Solução Padrão - CAS [7664-93-9]
  - ◆ Água Destilada
- 
- ◆ Transferir cuidadosamente e com o auxílio de uma bureta, 40 mL da solução de ácido Sulfúrico 0,5N para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, já contendo cerca de 500 mL de água destilada;



- ◆ Agitar vagarosamente com movimentos rotatórios;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com água destilada;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco escuro.

## SOLUÇÃO DE ÁCIDO BÓRICO 2%

### Composição Química

- ◆ Ácido Bórico -  $H_3BO_3$  - CAS [10043-35-3]
  - ◆ Água Destilada
- ◆ Pesar, em balança de precisão, 20 g de ácido Bórico, em becker de 1000 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar 300 mL de água destilada;
- ◆ Solubilizar bem;
- Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, lavando o becker com pequena porção de água destilada;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com água destilada;
  - ◆ Homogeneizar bem;
  - ◆ Armazenar esta solução em frasco de polietileno.

## INDICADOR MISTO DE VERMELHO DE METILA + VERDE DE BROMICRESOL

### Composição Química

- ◆ Vermelho de Metila -  $C_{15}H_{15}N_3O_2$  - CAS [493-57-2]
- ◆ Verde de Bromocresol -  $C_{21}H_{14}Br_4O_5$  - CAS [76-60-8]
- ◆ Álcool Etilico -  $C_2H_6O$  - CAS [64-17-5]



Em balança analítica, pesar 0,06g de Vermelho de Metila, em becker de 100 mL de capacidade;

◆ Adicionar exatamente 60 mL de álcool Etílico e solubilizar bem mediante agitação;

Em balança analítica, pesar 0,15g de Verde de Bromocresol, em becker de 250 mL de capacidade;

◆ Adicionar exatamente 150 mL de álcool Etílico e solubilizar bem mediante agitação;

◆ Misturar quantitativamente as duas soluções de indicadores;

◆ Homogeneizar bem;

◆ Armazenar esta solução em frasco conta-gotas.