

## DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO EM MACRÓFITAS AQUÁTICAS E SEDIMENTOS - ADEQUAÇÃO DE PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.

APRILE, F.M.<sup>(1)</sup> & BIANCHINI Jr., I.<sup>(2)</sup>

Com base nas diversas propostas, descritas na literatura, no que se refere a quantificação do teor de nitrogênio orgânico através do método de Kjeldahl, nesse trabalho propõe-se algumas variações dessa metodologia, no sentido de adequá-la e otimizar-la para amostras de plantas aquáticas e sedimentos. De modo geral, tanto para as plantas aquáticas quanto para os sedimentos, as quantidades de amostras que se revelaram adequadas estão compreendidas entre 0,1 e 0,4 g (em peso seco). Verificou-se, também, que a confecção de curva padrão propiciou maior segurança e precisão nas determinações.

**ORGANIC NITROGEN DETERMINATION IN AQUATIC MACROPHYTES AND SEDIMENTS SAMPLES - METHODOLOGICAL ADEQUATIONS.** In order to fit the Kjeldahl method for the aquatic plants and sediments samples, in this study was discussed some aspects related with this analytic procedure of organic nitrogen determination. The assays allowed to get the suitable quantities of the reagents and of the samples mass, as well, to get the calibration curve from urea.

### INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um constituinte estrutural de uma ampla variedade de substâncias orgânicas que compõem os organismos, tais como: os aminoácidos, os nucleotídeos, as porfirinas e os alcalóides. É especialmente importante na ligação dos polipeptídeos, necessários para a formação das proteínas. O processo de produção primária que condiciona, em grande parte, a riqueza de espécies e as intensidades dos fluxos nos ecossistemas, pode ter no nitrogênio um de seus principais fatores limitantes (HUTCHINSON, 1967). A partir de extensa revisão realizada por LITTLE (1979) é possível verificar que para as plantas aquáticas, o teor de nitrogênio orgânico total varia em torno de 1 a 5% do seu peso seco, dependendo da espécie e estado fenológico. Estudos de decomposição em sistemas terrestres e aquáticos têm revelado que os teores de nitrogênio orgânico dos detritos tendem ser mais elevados que os dos recursos originais, devido a agregação de microrganismos e/ou as baixas taxas de perda de massa destes compostos (SWIFT *et al*, 1979; BIANCHINI Jr, 1982; 1985).

Nos sistemas aquáticos, quando presente em baixas concentrações, o nitrogênio pode atuar como fator limitante na produção primária. Em altas concentrações, pode afetar a dinâmica do oxigênio dissolvido, interferindo diretamente sobre a comunidade dos heterótrofos (ODUM, 1985; WETZEL, 1975). As formas pelas quais os compostos de nitrogênio aportam nos ambientes aquáticos é extremamente variável e dependem de vários fatores, dentre eles citam-se: os eventos meteorológicos e as emissões industriais, domésticas e agrícolas (ESTEVES, 1988).

---

(1) Estagiário do Departamento de Hidrobiologia, UFSCar

(2) PPG-ERN/ Depto. Hidrobiologia, UFSCar

Nesse sentido, o conhecimento das concentrações de nitrogênio, nos ambientes aquáticos, é de grande importância, uma vez que, o grau de eutrofização desses ecossistemas pode estar diretamente relacionado a quantidade deste elemento. Por exemplo, em lagos eutróficos de regiões temperadas, o teor de nitrato pode exceder a 1 mg/l, salvo no epilímnio (BAYLY e WILLIAMS, 1973). O nitrogênio pode estar presente nos sistemas aquáticos sob várias formas orgânicas e inorgânicas, tais como: proteínas, aminoácidos, peptídeos, nitrato, nitrito, amônia, íon amônio, óxido nitroso, nitrogênio molecular, etc. A amônia, em particular, pode ser encontrada na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) ou não (por exemplo:  $\text{NH}_3$  (g), e  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), dependendo, basicamente, do potencial de oxidação e da temperatura (EPA, 1985).

Em virtude dos fatores anteriormente mencionados, o aprimoramento dos procedimentos analíticos de quantificação do nitrogênio torna-se evidente, tanto para a melhoria de seu gerenciamento, quanto para a atenuação ou mesmo solução de problemas decorrentes de seu acúmulo ou escassez.

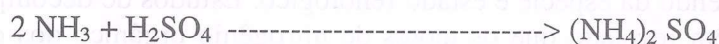
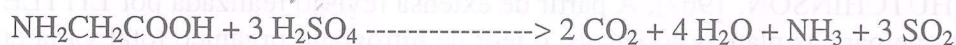
## OBJETIVOS

Devido a grande importância no nitrogênio nos ecossistemas aquáticos e com base nas várias propostas de quantificá-lo em suas formas orgânicas, através do método de Kjeldahl, esse trabalho visa discutir algumas variações metodológicas, no sentido de adequá-lo para determinações em amostras de macrófitas aquáticas e de sedimentos.

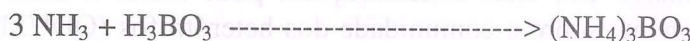
## MATERIAIS E MÉTODOS

O método de Kjeldahl é um procedimento analítico de quantificação de nitrogênio orgânico total bastante difundido e utilizado. Basicamente, constitui-se das seguintes etapas: digestão ácida, destilação e titulação do destilado (KOLTHOFF *et al*, 1969; ALLEN *et al*, 1974). De modo geral, esse método pode ser descrito a partir das seguintes reações:

### 1ª ETAPA: Digestão Ácida



### 2ª ETAPA: Destilação



### 3ª ETAPA: Titulação



Na etapa de digestão utilizou-se várias quantidades de amostras (de 0,1 a 1g) de 3 diferentes espécies de plantas aquáticas, previamente secas e moídas (*Pistia stratiotes*, *Nymphoides indica* e *Eichhornia crassipes*). Para os sedimentos utilizou-se na digestão, somente, amostras com 0,3 g.

Convém ressaltar que antes do processo de secagem das macrófitas, deve-se cuidar para que elas sejam lavadas, minuciosamente, para a remoção de partículas de sedimentos e de outros materiais/organismos aderidos. Nesse trabalho, o processo de secagem das plantas e dos sedimentos iniciou-se ao ar livre e em seguida, prosseguiu em estufa (55 °C), até que as amostras apresentassem peso constante.

Para iniciar o processo de digestão colocou-se as amostras de plantas e de sedimento dentro de tubos de ensaios longos e adicionou-se 0,1 g de catalisador misto<sup>1</sup> e mercúrio. Na sequência, adicionou-se ácido sulfúrico concentrado (P.A.). Neste procedimento procurou-se "lavar" as paredes dos tubos retirando-se, desse modo, as partículas de amostras que ficaram aderidas. Nessa etapa testou-se, também, a quantidade de ácido adicionado.

Em capela de exaustão, os tubos de digestão foram aquecidos, no início, a uma temperatura aproximada de 50 °C. Após 10 minutos de digestão aumentou-se a temperatura, gradualmente, até 300 °C. Temperatura na qual os processos de digestão foram realizados, até que as amostras se tornassem límpidas.

Após atingirem temperaturas compreendidas entre 150 e 250 °C, algumas vezes foi necessário que se deixasse ocorrer a digestão nesse intervalo por, aproximadamente 15 minutos, para evitar a perda de parte das amostras, pois devido a rápida ebulição do ácido, parte das amostras poderiam aderir-se nas paredes superiores dos tubos e na sequência do processo, serem calcinadas.

Ainda com relação a digestão, vale assinalar que, em geral, amostras de macrófitas que contém raízes levam a solução final da digestão a uma cor avermelhada (ESTEVES, 1979).

Nesse estudo padronizou-se o tempo de digestão, em 3 horas, após as amostras atingirem a temperatura de 300 °C. Com o término dos processos de digestão e de resfriamento, as soluções resultantes (digeridos) foram transferidas para balões volumétricos de 25 e/ou 50 ml e os volumes completados com água destilada (SOLUÇÃO "A").

De modo geral, a segunda fase do procedimento constitui-se na adição de alíquotas das soluções "A" em destilador do tipo "MARKAN". Para cada destilação, acoplou-se na saída do condensador uma proveta que continha solução de ácido bórico (2%) e 4 gotas de indicador<sup>2</sup>, de modo que o liberado da destilação entrasse diretamente em contato com a solução de ácido bórico.

Nessa fase testou-se a adição de diferentes volumes de alíquotas das soluções "A" (de 4 a 20 ml) no destilador, assim como o volume de ácido bórico (10 e 20 ml). De acordo com esse método, nessa etapa, além da SOLUÇÃO "A" adiciona-se, também, no destilador 15 ml de solução de NaOH (46%). A destilação foi considerada terminada até o volume da proveta, que continha ácido bórico, ser completado em 40 ml (SOLUÇÃO "B").

<sup>1</sup> Homogeneizado de 80,0 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0 g de Se e 5,0 g de CuSO<sub>4</sub>.

<sup>2</sup> Solução mista (1:1) de verde de bromocresol (0,66% em etileno glicol) e vermelho de metila (0,33% em etileno glicol).

Terminadas as destilações, titulou-se cada solução "B", que apresentava cor verde, com ácido sulfúrico 0,01 N até a mudança da cor para vermelho.

Em adição aos testes anteriormente mencionados elaborou-se uma curva padrão utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio e fixadas as seguintes variáveis:

- 1°. Digestão ácida: uréia + 0,1 g catalisador misto + mercúrio + 5 ml de ácido sulfúrico conc.; tempo: 3 horas após atingir 300 °C; volume final da solução "A" = 25 ml;
- 2°. Destilação: volume da solução "A" a ser destilado = 4 ml; volume de NaOH (46%) = 15 ml; volume da solução de ácido bórico = 10 ml; 4 gotas de indicador misto; volume final da destilação = 40 ml.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados através da Tabela I verifica-se que :

1°. Ao dobrar o volume da alíquota a ser destilada (solução "A") da amostra 2, em relação ao da amostra 1, houve um incremento proporcional no volume de ácido necessário na titulação;

2°. Ao comparar os resultados das titulações das amostras 1 e 3 nota-se que a duplicação da quantidade de amostra a ser digerida (referente a amostra 3) foi anulada pela diluição efetuada (50 ml) na solução resultante da digestão solução "B";

3°. A variação de volume de ácido sulfúrico efetuada no processamento da digestão das amostras 3 e 4 foi anulada na fase de diluição. As quantidades de ácido utilizadas nas titulações dessas amostras foram diferentes pois na amostra 4, o volume de destilado foi menor que da amostra 3, uma vez que, o ponto final da destilação foi previamente convencionado em 40 ml;

4°. Do mesmo modo que no caso anterior, as variações entre os procedimentos realizados junto as amostras 3 e 5 foram anulados na etapa de diluição e portanto, considera-se equivalentes as quantidades de ácido sulfúrico 0,01 N consumidas na titulação (6,05 e 6,15 ml), indicando que 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram suficientes para realizar a digestão.

Os resultados das amostras 7 a 13 (Tabela I) referem-se ao sedimento coletado na Lagoa Dourada (22° 11' 33" S e 47° 55' 2" W). Essas determinações indicam que a proporções adotadas nas amostras 7 e 10 foram suficientes e adequadas para as determinações de nitrogênio orgânico.

De acordo com os resultados apresentados através da Tabela I determinou-se que tanto para as amostras de macrófitas, quanto para as de sedimentos:

TABELA I -Variações realizadas nas diferentes etapas da determinação de nitrogênio orgânico total.

| Amostra<br>n° | Substrato        | Massa<br>(g) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>conc. (ml) | Diluição<br>(ml) | Alíquota<br>(ml) | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub><br>(ml) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,01N (ml) |
|---------------|------------------|--------------|----------------------------------------------|------------------|------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1             | <i>N. indica</i> | 0,3          | 5,0                                          | 25,0             | 4,0              | 10,0                                   | 5,95                                         |
| 2             | <i>N. indica</i> | 0,3          | 5,0                                          | 25,0             | 8,0              | 10,0                                   | 12,05                                        |
| 3             | <i>N. indica</i> | 0,6          | 5,0                                          | 50,0             | 4,0              | 10,0                                   | 6,05                                         |
| 4             | <i>N. indica</i> | 0,6          | 10,0                                         | 50,0             | 4,0              | 20,0                                   | 5,25                                         |
| 5             | <i>N. indica</i> | 0,6          | 10,0                                         | 50,0             | 4,0              | 10,0                                   | 6,15                                         |
| 6             | <i>N. indica</i> | 0,3          | 5,0                                          | 50,0             | 4,0              | 10,0                                   | 0,70                                         |
| 7             | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 25,0             | 4,0              | 10,0                                   | 1,45                                         |
| 8             | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 100,0            | 20,0             | 10,0                                   | 0,35                                         |
| 9             | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 50,0             | 4,0              | 10,0                                   | nd                                           |
| 10            | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 25,0             | 4,0              | 10,0                                   | 0,40                                         |
| 11            | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 50,0             | 8,0              | 10,0                                   | nd                                           |
| 12            | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 100,0            | 20,0             | 10,0                                   | nd                                           |
| 13            | Sedimento        | 0,3          | 5,0                                          | 100,0            | 20,0             | 10,0                                   | 1,60                                         |

nd = não detectado

1. o volume de 5 ml de ácido sulfúrico era o suficiente para ser empregado no processo de digestão;
2. a diluição do produto da digestão (solução "A") até o volume de 25 ml era a adequada e suficiente;
3. o volume de 4 ml de solução "A" era o adequado para ser introduzido no destilador e o de 10 ml de ácido bórico, o suficiente para a colheita do destilado.

No que se refere a curva padrão verifica-se, através da Figura 1A, que esse método se mostrou bastante sensível as variações de concentração de uréia, assim como pode-se ajustar os resultados a um modelo de equação linear ( $y = 1,34x - 0,26$ ). Indicando que a partir do emprego das recomendações discutidas, obtém-se significativa proporcionalidade entre volume de ácido utilizado na titulação e concentração de nitrogênio, presente nas amostras ( $r^2 = 0,99$ ).

Nesse sentido, na comparação dos resultados apresentados através da Tabela II, nota-se a grande similaridade entre os valores obtidos a partir da curva padrão e os calculados através das relações estequiométricas das reações envolvidas.

TABELA II - Teores de nitrogênio orgânico obtidos a partir da curva padrão e dos cálculos estequiométricos.

| Substrato                   | Massa<br>(g) | Nitrogênio Orgânico<br>(%) |                |
|-----------------------------|--------------|----------------------------|----------------|
|                             |              | Curva Padrão               | Estequiometria |
| <i>Nymphoides indica</i>    | 0,1          | 1,65                       | 1,706          |
|                             | 0,2          | 1,39                       | 1,514          |
|                             | 0,3          | 1,45                       | 1,619          |
|                             | 0,4          | 1,45                       | 1,630          |
|                             | Média:       | -                          | 1,617          |
| <i>Eichhornia crassipes</i> | 0,1          | 1,13                       | 1,094          |
|                             | 0,2          | 1,22                       | 1,312          |
|                             | 0,3          | 0,98                       | 1,079          |
|                             | 0,4          | 0,97                       | 1,083          |
|                             | Média:       | -                          | 1,142          |
| <i>Pistia stratiotes</i>    | 0,3          | 2,19                       | 2,479          |
|                             | 0,4          | 1,68                       | 1,914          |
|                             | 0,5          | 1,97                       | 2,257          |
|                             | 0,6          | 1,67                       | 1,917          |
|                             | 0,7          | 1,71                       | 1,969          |
|                             | 0,8          | 1,57                       | 1,810          |
|                             | 0,9          | 1,87                       | 2,163          |
|                             | Média:       | -                          | 2,062          |

Embora os valores, obtidos a partir da curva padrão, sempre tenham se apresentado menores que os decorrentes dos cálculos estequiométricos, observa-se que a diferença percentual entre suas médias é menor que as verificadas quando se alterou a quantidade amostral. Nesse caso constata-se que as diferenças resultantes entre esses dois métodos de cálculo são menores que as envolvidas quando se processam réplicas amostrais.

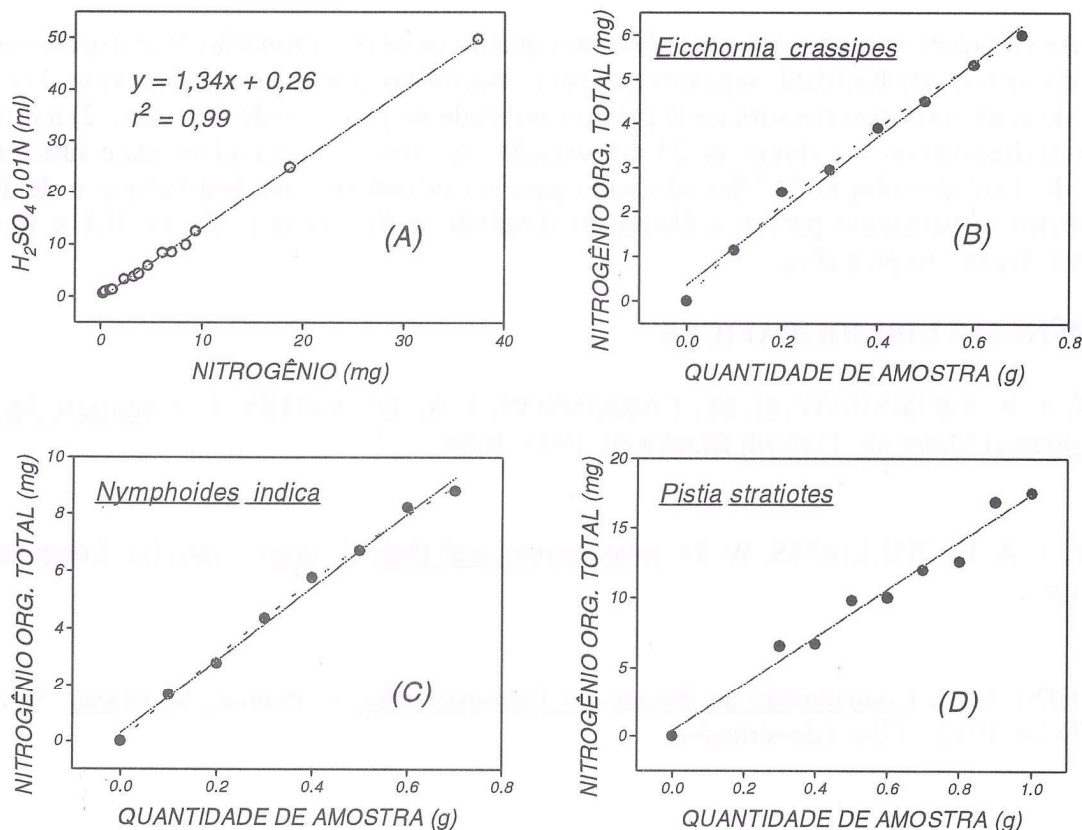


FIGURA 1 - Curva padrão obtida a partir de uréia e de acordo com as adequações recomendadas (A). Efeito da quantidade de amostra de plantas sobre a eficiência das determinações de nitrogênio orgânico (B, C e D).

Através da Figura 1 (B e C) verifica-se que, para *Eichhornia crassipes* e *Nymphoides indica*, a proporcionalidade entre quantidade de amostra e o teor de nitrogênio orgânico foi mantida ao longo do teste de variação do peso de amostra a ser digerida (traço contínuo). No entanto, com base nestes mesmos resultados é possível, também, a interpretação de que possa ter ocorrido, para estas determinações, alguma limitação metodológica que tenderia subestimar os teores de nitrogênio orgânico para amostras com muita massa (traço pontilhado). Por outro lado, o teste de quantidade de amostra que envolveu *Pistia stratiotes* não acusou restrição até a última quantidade ensaiada (Figura 1D). Considerando que a perda da proporcionalidade entre o teor de nitrogênio orgânico e quantidade de amostra decorra de algum fator limitante metodológico, a partir destes resultados sugere-se que se deva, rotineiramente, submeter à digestão amostras com pouca massa, afim de se garantir tal proporcionalidade, independente da espécie de macrófita aquática em análise.

De modo geral, embora os resultados verificados para *Pistia stratiotes* demonstrem que seja possível a digestão de amostras com até 1,0 g, os demais indicam que amostras dessa natureza devam conter massa com até 0,4 g (peso seco), no sentido de se evitar possíveis subestimativas dos teores de nitrogênio orgânico devido alguma limitação metodológica. Vale ressaltar ainda, com relação a metodologia utilizada, alguns cuidados básicos para o êxito das determinações, entre eles: uma limpeza adequada da vidraria e a utilização de réplicas. É indispensável, também, efetuar uma determinação em Branco, na qual, utilizam-se todos os reagentes menos a amostra, de modo a eliminar possíveis interferências.

## CONCLUSÕES

As variações impostas aos procedimentos analíticos de determinação de nitrogênio orgânico, através do método de Kjeldahl, sugerem que para macrófitas aquáticas e sedimentos: 1) o volume de 5 ml de ácido sulfúrico foi suficiente para ser utilizado no processo de digestão; 2) a diluição do produto da digestão até o volume de 25 ml (solução "A") mostrou-se a adequada e suficiente; 3) o volume de 4 ml de solução "A" foi adequado para ser introduzido no destilador e o de 10 ml de ácido bórico o suficiente para a colheita do destilado e 4) amostras de até 0,4 g devem ser preferencialmente empregadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S. E., GRIMSHAW, H. M., PARKINSON, J. A., QUARMBY, C. Chemical Analysis of Ecological Materials. Oxford: Blackwell, 1974. 565p.
- BAYLY, I. A. E., WILLIAMS, W. D. Inlandwaters and their Ecology. Australia: Longman, 1973. 316 p.
- BIANCHINI Jr., I. Contribuição ao Estudo da Decomposição de Plantas Aquáticas. São Carlos: UFSCar, 1982. 178p. (dissertação).
- BIANCHINI Jr., I. Estudo da Humificação de *Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze. São Carlos: UFSCar, 1985. 285p. (tese).
- EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY. Rates, Constants and Kinetics Formulation in Surface Water Quality Modeling. Athens: U.S. Government Printing Office, 1985. 455 p.
- ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência, 1988. 575p.
- ESTEVES, F. A. Guia de Aula Prática - Curso de Ecologia de Macrófitas Aquáticas. São Carlos: PPGERN - UFSCar, 1979. 38 p.
- HUTCHINSON, G. E. A Treatise on Limnology - II. Introduction to the lake biology and the limnoplankton. New York: Wiley, 1967. 1115p.
- KOLTHOFF, D. M. *et al.* Quantitative Chemical Analysis. New York: MacMillan, 1969.
- LITTLE, E. C. S. Handbook of Utilization of Aquatic Plants. FAO Fish. Tech. Pap. (187), 1979. 176p.
- ODUM, E. P. Ecologia. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. 434 p.

SWIFT, M. J., HEAL, D. W., ANDERSON, J. M. Studies in Ecology-Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Oxford: Blackwell, 1979. 371p.

WETZEL, R.G. Limnology. Philadelphia: Saunders, 1975. 743p.

---

**Agradecimentos:**

Os autores agradecem aos professores da área de Química Analítica, do Departamento de Química da UFSCar, pelo apoio dispensado durante a execução desses ensaios e, em particular, ao Prof. Dr. Adalberto P. P. Toledo pela cessão do laboratório.

**Endereço dos autores:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Cx. Postal, 676 - 13565-905, São Carlos (SP), Brasil  
E-mail: IRINEU@POWER.UFSCAR.BR