

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMÔNIO EM EXTRATOS DE CARNE, COM SALICILATO E HIPOCLORITO, SEM PRÉVIA NEUTRALIZAÇÃO DOS DÍGERIDOS SULFÚRICOS.

Júlio Cesar Rocha¹, Celso Augusto Fessel Graner² e Romeu Magnani³.

¹*Departamento de Química Analítica - Instituto de Química da UNESP - 14800 - Araraquara - SP.*

²*Departamento de Química - Instituto de Biociências da UNESP - 18600 - Botucatu - SP.*

³*Departamento de Físico-Química - Instituto de Química da UNESP - 14800 - Araraquara - SP.*

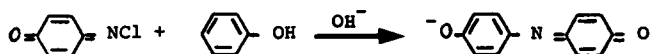
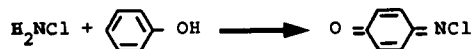
Recebido em 22/03/89

ABSTRACT

The substitution of phenol by salicylate in the Berthelot reaction (formation of the indophenol blue) and a colorimetric method for the determination of total nitrogen (or crude protein) in meat and meat products is described. The influence of the reagents and interfering ions concentration has been studied upon time and temperature of the reaction, useful life of the reagents; precision and accuracy. The absorbance measurements were performed on 645nm, with the Lambert-Beer law obeyed in the concentration range about 10 to 55 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of nitrogen. The regression equation ($A = -0.033 + 0.23 \mu\text{mol.L}^{-1} N$), was obtained with coefficient linear correlation (r) 0.9999.

INTRODUÇÃO

Vários métodos colorimétricos para a determinação de nitrogênio em matrizes biológicas tem sido desenvolvidos e/ou adaptados baseando-se na reação de Berthelot¹. O produto final, azul de indofenol, é obtido através da reação de fenol com amônia e hipoclorito em meio alcalino, conforme as reações^{2,3}:



Entretanto, além do fenol caracterizar-se como uma

substância tóxica e volátil, há ainda a formação de um intermediário de forte odor. Segundo Verdouw et al⁴, este intermediário foi isolado e, estudos de espectroscopia no infra-vermelho, indicaram a presença de orto-clorofenol. Este composto penetra na pele humana e é cerca de três vezes mais tóxico que o fenol⁵.

Roskam e Langen⁶, substituíram o fenol por timol para determinar amônia na água do mar e citam um mecanismo para a reação, segundo o qual há formação de um composto final do tipo indofenol. Em estudos cinéticos, Patton e Crouch², propõem a formação de monoclóroamina como primeiro intermediário e confirmam o produto final, indofenol, conforme o trabalho de Bolleter et al³.

Após o trabalho de Searcy et al⁷, tem-se explorado a possibilidade de substituir o fenol por salicilato como alternativa para determinação colorimétrica de nitrogênio amoniacal pois, neste caso, não há formação de orto-clorofenol⁵. O nome de "azul de indofenol", entretanto, tem sido mantido⁴.

Quanto à determinação de nitrogênio em amostras de carnes, Rocha et al¹⁰ propuseram um procedimento alternativo para digestão sulfúrica⁸ e investigaram a precisão/exatidão dos resultados em função da homogeneização, tamanho da amostra e do número de repetições⁹. Estes autores¹⁰ estudaram diversos sistemas catalisadores da digestão sulfúrica de amostras de carne. Através de análise estatística dos resultados e de considerações à respeito da toxicidade das espécies envolvidas, propuseram a substituição do mercúrio, recomendado pela AOAC¹¹, por cobre. Também propuseram um procedimento colorimétrico para determinar nitrogênio total em carnes e derivados, utilizando-se salicilato e a técnica de análise por injeção em fluxo¹².

Assim, neste trabalho investigaram-se: a) parâmetros envolvidos na formação do "azul de indofenol" a partir de salicilato, para ajustar o método colorimétrico de determinação de nitrogênio em amostras de carnes e produtos afins; b) o pH do meio, de modo que as alíquotas (provenientes de digestão ácida) tomadas para análise, não necessitem de ajuste prévio; c) prováveis espécies interferentes, inerentes à matriz da amostra, bem como aquelas que possam estar presentes devido à indispensável participação no processo da digestão sulfúrica.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos:

Espectrofotômetros Varian-Cary 219 e Micronal B342 II, ambos com cubetas de vidro de 10mm de caminho óptico.

Reagentes:

Solução padrão "estoque" de amônio $6,000 \cdot 10^4 \mu\text{mol.L}^{-1}$: dissolveram-se 3,9642 g de sulfato de amônio, seco em estufa a 110°C por 1 hora, e transferiu-se para balão volumétrico de 1 litro.

Solução padrão de amônio $2,250 \cdot 10^2 \mu\text{mol.L}^{-1}$: preparou-se através de diluição da solução padrão "estoque" de amônio.

Solução de nitroprussiato $2,000 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1}$: dissolveu-se 0,5959 g de nitroprussiato de sódio, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, estocou-se em frasco ambar mantido no refrigerador.

Solução de salicilato $1,25 \text{ mol.L}^{-1}$ / hidróxido de sódio $9,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ / nitroprussiato $4,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ / sulfato de potássio $1,00 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ (COQUETEL DE REAGENTES): dissolveram-se 21,50 g de hidróxido de sódio, com cerca de 100 ml de água destilada, para reação com 43,16 g de ácido salicílico. Após resfriamento, filtrou-se para balão de 250 ml, adicionaram-se 5 ml da solução de nitroprussiato e 4,40 g de sulfato de potássio previamente dissolvidos em água. Completou-se o volume, estocou-se em frasco de polietileno envolto em papel alumínio mantido no refrigerador. Esta solução pode ser utilizada até quatro dias após sua preparação.

Fonte de íons hipoclorito: utilizou-se água sanitária com concentração de $4,4 \text{ mol.L}^{-1}$ em hipoclorito, padronizada segundo Vogel¹³.

Interferentes: prepararam-se soluções contendo $2,50 \cdot 10^2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em cálcio, magnésio, cobre, perclorato, mercúrio (II) e selênio (IV), e soluções contendo $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em molibdênio, zinco, ferro (III), manganês (II) e alumínio.

Amostras: nos ensaios a respeito das variáveis que podem afetar a colorimetria do íon amônio, utilizou-se solução $2,250 \cdot 10^2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ nesse íon nas diluições necessárias. Como amostra de carne utilizou-se charque, manipulada e com seu extrato sulfúrico obtido segundo Rocha et al^{8,9}, empregando-se cobre como catalisador¹⁰ (resumidamente, sistema constituído de amostra mais ácido sulfúrico concentrado e mistura digestora/catalisador de $\text{K}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$ aquecido a cerca de $350\text{-}400^\circ\text{C}$, em bloco digestor até líquido límpido e levemente esverdeado).

Determinações de nitrogênio: as condições experimentais podem ser assim resumidas: a) após a digestão, o extrato ácido foi diluído a 250 ml. Transferiram-se 5,00 ml para balão de 50 ml e completou-se o volume. Deste, retiraram-se alíquotas (em triplicatas) de 0,50, 1,00 e 2,00 ml, com as quais fizeram-se as determinações do método espectrofotométrico. As concentrações de nitrogênio amoniacal no volume final para colorimetria (25 ml) devem estar entre cerca de 10 e $55 \mu\text{mol.L}^{-1}$; b) adicionaram-se, pela ordem, 7,50 ml da solução "coquetel de reagentes", alíquota da amostra digerida e 6 gotas da solução de hipoclorito; c) completou-se rapidamente o volume com água e homogeneizou-se; d) colocou-se o balão volumétrico em banho térmico a 35°C e, após 30 minutos, resfriou-se até temperatura ambiente e

leu-se a absorvância a 645 nm. Os 245 ml restantes de cada digerido foram utilizados nas determinações de nitrogênio através do método titulométrico consolidado da destilação da amônia e recepção em excesso de ácido bórico, com posterior titulação do borato formado. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

A precisão do método foi estudada em função da reprodutividade dos valores das absorvâncias observadas utilizando-se várias alíquotas da solução padrão de amônio $2,250 \cdot 10^2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para a obtenção de curva padrão com seis pontos, entre 9 e $54 \mu\text{mol N}(\text{NH}_4^+). \text{L}^{-1}$. Os dados referentes a cinco repetições para cada ponto da curva referida, encontram-se na tabela 1 e a equação de regressão correspondente é: $A = -0,033 + 0,023 \mu\text{mol.L}^{-1}\text{N}$, com coeficiente de correlação linear $r = 0,9999$.

Seleção das condições experimentais:

a) Concentração dos reagentes

Para salicilato de sódio, hipoclorito de sódio e nitroprussiato de sódio, as concentrações mais adequadas foram selecionadas variando-se suas respectivas quantidades dentre os valores mais citados na literatura. Quanto a ácido sulfúrico e sulfato de potássio, suas concentrações foram estudadas baseando-se nas quantidades dessas espécies utilizadas na digestão das amostras e nas diluições do extrato até o volume final para colorimetria.

Os ensaios foram realizados variando-se a concentração de um dos reagentes mantendo-se fixa a dos demais. Esse procedimento permitiu estabelecer as respectivas concentrações dos reagentes na solução "coquetel de reagentes".

b) Tempo/Temperatura

Investigaram-se, também, as influências do tempo de reação (30-60-90 e 120 minutos) e da temperatura (ambiente, 22 a 28°C ; em banhos térmicos, a 35°C e a 45°C), na formação do "azul de indofenol", fazendo-se as leituras das absorvâncias após variar estes dois parâmetros, ora mantendo um deles fixo, ora interrelacionando-os por variações simultâneas.

c) Vida útil dos reagentes

Através de duas soluções "coquetel de reagentes" (preparadas como descrito em Reagentes), estudaram-se suas estabilidade em função do tempo e condições de estocagem. Para tal, manteve-se uma solução no refrigerador e a outra a temperatura ambiente. Ambas foram utilizadas no dia, e após 4, 9 e 13 dias após a preparação, comparando-se os resultados obtidos.

d) Influência de interferentes

Soluções contendo ou não íons naturalmente encontrados em amostras de materiais biológicos, ou aqueles introduzidos no processo de digestão sulfúrica (conforme qualidade e concentrações constantes da tabela 3), foram preparadas para "interferir" na colorimetria do nitrogênio, como proposta.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No intervalo de concentração de hipoclorito de sódio estudado (entre 2,5 e 17,5 mmol L⁻¹) os valores das absorvâncias foram menores nos extremos e, conseqüentemente, mais elevados para as concentrações intermediárias (entre 4,5 e 9,0 mmol L⁻¹). Confirmando o que outros autores sugeriram^{2,14}, isto indica a existência de um intervalo fora do qual a sensibilidade fica comprometida. Nas condições experimentais estabelecidas, concentrações de hipoclorito de sódio menores que 4,5 mmol L⁻¹ não são suficientes para completar a reação e, maiores 9,0 mmol.L⁻¹ devem inibir a formação do "azul de indofenol".

Os ensaios a respeito das concentrações de hidróxido de sódio e de nitroprussiato de sódio mostraram, também, concentrações fora das quais os valores das absorvâncias decrescem. Isto confirmou ser o sistema em questão altamente dependente da alcalinidade^{2,14} e que a quantidade de nitroprussiato também influi na formação do "azul de indofenol". Assim, estabeleceram-se 9,0.10⁻¹ e 4,00.10⁻⁴ mol.L⁻¹ para concentrações hidróxido e nitroprussiato, respectivamente, na solução "coquetel de reagentes".

A tabela 2 apresenta os resultados de determinações de nitrogênio total em amostras de charque, feitas através dos métodos espectrofotométricos (médias de 3 repetições) e titulométrico. As determinações espectrofotométricas são oriundas de dez digeridos de amostras de charque dos quais, de cada um deles, retiraram-se três alíquotas de volumes diferentes e cada uma em triplicata, ou seja, um total de noventa determinações.

O método titulométrico foi aplicado nas dez alíquotas restantes de cada digerido. Assim, este estudo implicou em pelo menos cem determinações.

Os resultados da análise estatística permitem considerar que o procedimento proposto para determinação espectrofotométrica de nitrogênio total (ou proteína bruta) é tão eficaz quanto o método titulométrico. Para tal, não é necessário ajustar o pH dos digeridos ácidos e as concentrações de nitrogênio amoniacal no volume final para espectrofotometria (25,00 ml) devem estar compreendidos entre cerca de 10 e 55 μmol.L⁻¹.

TABELA 1 - Precisão do método colorimétrico de determinação de nitrogênio amoniacal como proposto, avaliada através da variação nas absorvâncias de soluções padrões de N(NH₄⁺).

Concentração de N em μmol.L ⁻¹	Absorvâncias Médias (N=5) ± Intervalos de 95% de Confiança
9,0	0,173 ± 0,005
18,0	0,375 ± 0,005
27,0	0,578 ± 0,005
36,0	0,800 ± 0,011
45,0	0,995 ± 0,006
54,0	1,193 ± 0,016

TABELA 2 - Teores percentuais de nitrogênio total em charque, obtidos pelo método espectrofotométrico sugerido (com três repetições para cada alíquota utilizada do digerido líquido) e pelo método titulométrico. Intervalo de 95% de confiança (I.C.) para a média.

Amostras	Teor Percentual de Nitrogênio			
	Colorimetria/Alíquota (ml)			Titulometria
	0,50	1,00	2,00	
1	4,47	4,49	4,44	4,32
2	4,26	4,42	4,53	4,35
3	4,58	4,65	4,40	4,28
4	4,02	4,37	4,23	4,19
5	4,13	4,24	4,23	4,29
6	4,10	4,36	4,18	4,07
7	4,37	4,40	4,22	4,25
8	4,21	4,45	4,13	4,20
9	4,29	4,62	4,35	4,26
10	4,50	4,55	4,41	4,22
I.C.	4,29±0,13	4,46±0,09	4,31±0,09	4,24±0,06

TABELA 3 - Absorvâncias (médias de três repetições) do sistema do "azul de indofenol" com 27,0 μmol.L⁻¹ de NH₄⁺, obtidas em função de cada íon presente e de cada concentração dos mesmos, como "interferentes".

	ÍON Absorvâncias/Concentrações dos Íons (μmol.L ⁻¹)						
	0	0,2	0,6	1,2	10	30	60
Alumínio	0,558	0,565	0,569	0,570			
Ferro(III)	0,558	0,567	0,555	0,569			
Manganês (II)	0,558	0,557	0,568	0,561			
Molibdato	0,558	0,563	0,555	0,564			
Zinco	0,558	0,569	0,561	0,563			
Cálcio	0,558				0,556	0,554	0,556
Cobre (II)	0,558				0,558	0,557	0,632
Fosfato	0,558				0,569	0,568	0,569
Magnésio	0,558				0,561	0,554	0,555
Mercúrio (II)	0,558				0,540	0,552	0,497
Perclorato	0,558				0,560	0,549	0,556
Selenito	0,558				0,561	0,550	0,559

Quanto à influência de interferentes a tabela 3 apresenta os valores das absorvâncias utilizando-se $27,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrogênio amoniacal e, variando-se a espécie química supostamente interferente adicionada bem como a sua concentração. Uma análise de variância¹⁵ dos valores que geraram tais médias mostrou que não há diferenças significativas entre as mesmas, ao nível de 5% de significância. Logo, nos intervalos de concentração estudados, essas espécies não interferem nos valores das absorvâncias do sistema do "azul de indofenol".

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Proc. nº 84/0563-0).

REFERÊNCIAS

- ¹ Berthelot, M.; Rep. Chim. Appl. (1859) 1, 284.
- ² Patton, C.J.; Crouch, S.R.; *Anal. Chem.* (1977) 49, 464.
- ³ Bolleter, W.T.; Bushman, C.J.; Tidwell, P.W.; *Anal. Chem.* (1961) 33, 592.
- ⁴ Versouw, H.; Van Echteld, C.J.A.; Dekkers, E.M.J.; *Wat. Res.* (1978) 12, 399.
- ⁵ Bower, C.E.; Holm-Hansen, T.; *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (1980) 37, 794.
- ⁶ Roskan, R. Th.; Langen, D. de; *Anal. Chim. Acta.* (1964) 30, 56.
- ⁷ Searcy, R.L.; Reardon, J.E.; Foreman, J.A.; *Am. J. Med. Technol.* (1967) 33, 15.
- ⁸ Rocha, J.C.; Graner, C.A.F.; Magnani, R.; Ionashiro, M.; Ribeiro, C.A.; *Ecl. Quím.* (1968/1987) 11/12, 73.
- ⁹ Rocha, J.C.; Graner, C.A.F.; Magnani, R.; Ionashiro, M.; Ribeiro, C.A.; *Ecl. Quím.* (1986/1987) 11/12, 79.
- ¹⁰ Rocha, J.C.; Graner, C.A.F.; Magnani, R.; Ionashiro, M.; Ribeiro, C.A.; *Quím. Nova.* (1988) 11, 369.
- ¹¹ Horwitz, W., ed. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14 ed., Washington, AOAC, (1984) 16.
- ¹² Rocha, J.C.; Graner, C.A.F.; Magnani, R.; *Ecl. Quím.* (1988) 13, 71.
- ¹³ Vogel, A.I., *A text-book of quantitative inorganic analysis*, 3rd ed., London, Longmans, 1971, pp. 350 e 364.
- ¹⁴ Weatherburn, M.W.; *Anal. Chem.* (1967) 39, 937.
- ¹⁵ Gomes, F.P. *Curso de estatística experimental*, 10ª ed., Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1982.