

Considerações sôbre a dosagem do nitrogênio pelo método de Kjeldahl

Pedro Fontana

Laboratório de Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz

O método clássico para a determinação do nitrogênio total de um composto orgânico é o de DUMAS, que consiste na oxidação das substâncias orgânicas pelo CuO , absorção do CO_2 e do H_2O pela soda e H_2SO_4 sendo o N_2 medido volumetricamente. Os óxidos de N eventualmente formados são reduzidos por um fio de cobre incandescente colocado na corrente dos gases.

Posteriormente WILL e VARRENTAPP desenvolveram um método em que o material é aquecido em mistura com cal sodada, ao vermelho, sendo o NH_3 produzido recolhido em HCl diluído, determinando-se o NH_3 por gravimetria com o cloroplatinato de NH_3 . PELIZOT modificou o método usando um volume determinado de HCl padrão e titulando o excesso de ácido após a absorção de NH_3 (12).

KJELDAHL trabalhando com mosto de cervejaria desejava desenvolver um método que não obrigasse a redução do material a pó, que redundava em perda de tempo e introdução de erros. Tentou primeiro o método de WANKLIN para o N albuminoide que consiste na destilação com permanganato alcalino, obtendo depois melhores resultados aquecendo o material com permanganato e H_2SO_4 diluído. Finalmente chegou ao processo clássico que consiste no aquecimento da substância com H_2SO_4 concentrado seguido de adição cuidadosa de permanganato em pó. O próprio KJELDAHL já introduzira nestes primeiros tempos um catalizador de *oxidação* que foi o P_2O_5 (48).

O método de KJELDAHL (20) consiste em linhas gerais no seguinte:

1.^a fase

Mineralização do material por ação do H_2SO_4 em presença de catalizadores dando sulfato de amônio como produto final.

2.^a fase

A segunda fase consiste no deslocamento do NH_3 pela soda, destilação e absorção com uma solução ácida.

3.^a fase

A terceira fase consiste na titulação do NH_3 ou diretamente pelo HCl como se faz nos modernos métodos do ácido bórico e do K_2HPO_4 ou $\text{NiSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ou titulando-se o HCl não neutralizado por uma solução de soda padrão.

Recentemente foi introduzida uma modificação por MARCALI eliminando as 2.^a e 3.^a fases pela adição de aldeído fórmico ao resultado da digestão, depois da neutralização e posterior titulação da substância formada. O aldeído fórmico reage com o NH_3 formando hexametilenotetramina conforme a observação de KOLTHOFF (22). Mais adiante daremos detalhes de tôdas estas modificações mais modernas, que merecem ao nosso ver atenção mais demorada. Antes porém vamos dar uma rápida passagem pela evolução do método em cada uma das suas fases:

O método original de KJELDAHL consiste na ação do H_2SO_4 catalizado pelo P_2O_5 até que o líquido de pardo passe a amarelo. Junta-se então cuidadosamente KMnO_4 em pó para completar a oxidação enquanto o líquido está ainda quente. Dilui-se em pouco de água, alcaliniza-se e adiciona-se grânulos de Zn e distila-se o NH_3 para ser recebido na solução padrão de ácido.

WILLFARTH introduziu logo depois o uso de catalizadores metálicos para encurtar o tempo de digestão (54).

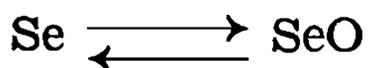
GUNNING empregou o KHSO_4 e ao mesmo tempo observou que o K_2SO_4 também acelerava a digestão pela elevação do ponto de ebulição do H_2SO_4 (10).

Os trabalhos de ARNOLD trouxeram vários aperfeiçoamentos à técnica do método quer pelo emprêgo do CuSO_4 com o Hg , quer pela introdução do ácido benzoico na análise de nitritos e nitratos, quer pelo estudo sistematizado do emprêgo dos diversos catalizadores usados na época, quer pelo estudo do problema do *N em anel* (ring N) (49).

Do princípio do século até 1930 a técnica da digestão não sofreu modificação importante, dedicando-se os pesquisadores mais ao aperfeiçoamento da aparelhagem do que à reação propriamente dita. A descoberta da enorme capacidade de catálise do Se feita por LAURO (23) despertou nos pesquisadores o interêsse pelo problema seguindo-se logo uma série de brilhantes estudos.

ILLARINOW e SSOLOVJENA (14) tentaram uma explicação do mecanismo de ação do Se o que foi completado pelo trabalho de SREENINASAN e SADAVISAN (41).

Segundo estes autores o Se e SeO formam um sistema de óxido-redução

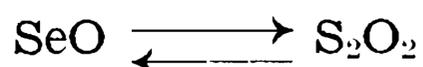


resultando daí as propriedades oxidantes.

Aliás já MELLOR no *Theoretical Inorganic Chemistry*, vol. X, página 433, edição de 1928 diz:

“O Se apresenta uma sequência alternada de oxidações e reduções”.

Em presença de Hg, a ação do Se é mais intensa e eficiente (32), porque então se forma um segundo sistema em que a sequência de oxidação e redução é muito mais rápida:



funcionando o Hg como acceptor de O.

Por outro lado, imediatamente após a descoberta de LAURO, já SANDSTED observou perdas por aquecimento prolongado com emprego de Se (38).

BRADSTREET observou que o aumento de Se, determina baixas no N (3).

VAN SLYKE e col. não conseguiram com nenhum dos catalizadores resultados satisfatórios para o triptofânio e a lisina que exigem aquecimento prolongado (47).

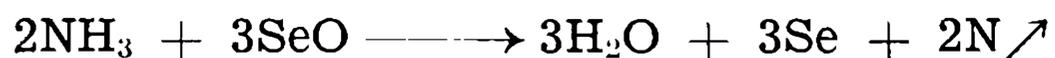
SREENINASAN observou que o uso de quaisquer catalizadores em quantidades maiores que o mínimo necessário determinam perdas em N (40).

O uso de ácido perclórico como foi recomendado por WICKS e FIRMINER (53) também resulta em perdas de N. Estas perdas são atribuídas a formação de N livre (35).

Com referência a esta formação de N livre encontramos o trabalho de SCAGLIARINI e TORELLI (39), que embora não diretamente, vem esclarecer melhor a questão. Demonstraram êstes autores a formação do ácido nitroso por aquecimento de NH_4SO_4 em solução sulfúrica, em presença de CuSO_4 .

Formado o nitrito de amônio êste se decompõe em H_2O e N_2 , resultando em perdas para a dosagem.

Com o SeO a reação se passa da seguinte maneira:



segundo MICHAELIS (28).

GORTNER e HOFFMAN demonstraram a formação de aminas que são dêste modo uma outra causa de perdas em N (9).

Estas perdas são entretanto insignificantes e desprezíveis quando o tempo de digestão é pequeno. No caso porém de substâncias mais resistentes, tomam um aspecto de problema às vêzes de difícil solução. O problema da dosagem do N em anel (ring N) por exemplo é atualmente dos que mais preocupam os pesquisadores no assunto. KIRK recomenda no seu magnífico estudo (18) um exame mais aprofundado da questão.

Estamos realizando em nosso laboratório um estudo das curvas de kjeldalização de diferentes substâncias contendo N em anel, em relação com o tempo. Aparentemente temos encontrado curvas características para cada tipo de anel, decorrentes talvez das diferentes compensações entre a digestão progressiva das substâncias e perdas em N. Isto será entretanto objeto de um outro trabalho.*

PATEL e SREENIVASAN (34) realizaram um estudo da digestão de substâncias com N em anel, obtendo bons resultados com o emprêgo de (Se + Hg) seguido de deslocamento (soda + tiosulfato). Admitem êles a formação de complexos amônio-mercúricos que protegem o NH_3 já formado de subsequente oxidação sem prejuízo para a marcha geral do método que só exige posteriormente o cuidado de se cindir êstes complexos para a libertação do NH_3 , o que se faz pelo tiosulfato.

Quanto ao mecanismo de formação de NH_3 os autores em geral admitem a ação deshidratante do H_2SO_4 a princípio seguida de oxidação.

O estudo do problema tem-se desenvolvido nos últimos anos com os trabalhos de MILBAUER (29), KAHANE e CARRERO (15), ROSENTHALER (37) e QUARTAROLI (36).

Parece que depois da deshidratação o processo segue um caminho complicado de oxidação e redução seguido na última fase de uma hidrólise que dá o NH_3 , como resultado.

Na parte final daremos a técnica que usamos como rotina em cerca de 500 dosagens da qual consta naturalmente a técnica da digestão usada em cada caso.

Realizada a digestão, a fase seguinte consiste no deslocamento do NH_3 pela soda concentrada com arrastamento por vapor d'água ou aeração até a solução que absorve o NH_3 (HCl, H_3BO_3 , etc).

Os primeiros pesquisadores usaram como aparelho um destilador comum. Mais tarde foi adaptado um sistema de segurança: "trap", consistindo de um alargamento em forma de bola impedindo a passagem direta do vapor que era condensado e então novamente vaporizado. Êste dispositivo impede a passagem de pequenas porções de soda para o destilado.

A primeira modificação importante foi introduzida por PARNAS (33), sendo o seu aparelho melhorado e aperfeiçoado por LOCKET (25), que o tornou tão simples que pode ser totalmente montado com material comum de laboratório. A vantagem dêstes aparelhos, é de se realizar muitas destilações seguidas sem necessidade de desmontá-lo, podendo ser facilmente lavado e carregado com o novo material.

Inspirado naturalmente nas vantagens da técnica introduzida por PARNAS, KIRK creou um aparelho em uma só peça, prevenindo com isto as possíveis perdas por escapamento nas conexões (17).

Usam também certos autores, vedar as conexões com silanos, procedimento que vem obtendo êxito (8).

* Durante a impressão do presente trabalho esses resultados foram publicados na Rev. Bras. Biol., 12, (3), 279-284, 1952.

Outro detalhe da técnica que pode ser igualmente causa de erro, é a transferência do material digerido para o aparelho de destilação. Por este motivo adotamos em nossa técnica de rotina uma bateria de frascos de digestão adaptáveis diretamente ao destilador. Esta técnica aliás já fôra usada por NEEDHAM e BOELL (30).

Para a absorção do NH_3 têm sido usadas soluções diluídas de HCl e H_2SO_4 desde os primeiros tempos do método. Entretanto outra técnica mais expedita se desenvolveu com o correr dos tempos. Já NEUMANN (31) em 1912 sugeriu o emprego de volumes de ácido muito menores que os necessários para neutralizar o NH_3 absorvido, usando-se depois o mesmo ácido para a titulação. Esta técnica eliminou a necessidade de 2 soluções-padrão.

Seguindo o mesmo caminho WINCKLER (55) apresentou um método de dosagem de NH_3 empregando o H_3BO_3 como absorvente e como indicador para titulação, o vermelho do Congo.

Baseando-se no trabalho de WINCKLER, STOVER e SANDIN (42) desenvolveram um método de dosagem do N usando como indicador um sistema de azul de metileno e vermelho de metila. O método foi adaptado às técnicas de semi-micro análise por WAGNER e MEEKER (52), ZUAZAGA e MA (56) introduziram o emprêgo do sistema de vermelho de metila e verde de bromocresol e por último CONWAY (6) empregou o indicador já misturado com a solução de ácido bórico. Outros absorventes têm sido usados e ultimamente DOYLE e OMATO usaram uma solução de K_2HPO_4 em lugar do ácido bórico, para absorver o NH_3 , com muito bons resultados (8). Da mesma maneira foi usado o $\text{Ni}(\text{SO}_4) \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por BLOM e SCHWARTZ (1).

Temos que nos deter agora entretanto, no exame de outro tipo de técnica que vem se desenvolvendo desde os trabalhos de CONWAY em 1933. Neste ano CONWAY e BYRNE (7) publicaram um método que consistia na difusão do NH_3 , deslocado por K_2CO_3 para uma solução diluída de H_2SO_4 . Usavam como câmara de difusão, um aparelho cilíndrico chato (no formato de um pequeno cristizador), constituído de dois compartimentos concêntricos, sendo a parede do interior mais baixa, o que permitia a difusão do NH_3 , depois de ajustada a tampa.

No compartimento externo coloca-se o material a dosar, no interno coloca-se a solução diluída de H_2SO_4 . Adiciona-se então ao compartimento externo a solução de K_2CO_3 para deslocar o NH_3 e ajusta-se a tampa deixando em repouso no mínimo 2 horas.

Os autores verificaram que em $1\frac{1}{2}$ horas 99,5% do NH_3 já estaria absorvido na solução de H_2SO_4 . Aliás CONWAY estabeleceu tabelas com as quais é possível fazer boas dosagens com tempos de difusão bem menores (5).

O método foi aperfeiçoado por TOMPKINS e KIRK (45) realizando a difusão no próprio frasco de digestão, que consiste de dois bulbos um menor (de digestão) e outro maior (de difusão), separados por um leve estrangulamento. O frasco é dotado de uma rolha esmerilhada especial, permitindo o estabelecimento de vácuo, à qual se liga uma

haste a cuja ponta está um reservatório onde se coloca a solução de H_2SO_4 . Quando se adapta a rolha esmerilhada, êste reservatório fica suspenso na parte central do bulbo de difusão.

Para se realizar uma determinação procede-se da seguinte maneira:

Digere-se o material no bulbo de digestão. Coloca-se a solução absorvente no reservatório da haste, junta-se soda concentrada, cuidadosamente, para não misturar com o material digerido antes de se vedar a câmara de difusão, o que se faz com uma pequena torsão da rolha esmerilhada, depois de se fazer o vácuo. Em seguida, agita-se para fazer a soda agir sobre o material digerido e deixa-se o NH_3 difundir por 2 horas no mínimo, titulando-se depois com microbureta. Uma boa técnica de trabalho com microburetas está exposta no livro de CONWAY (7).

Com uma rolha de borracha à qual se adapta uma haste com uma cubeta na extremidade e um tubo pequeno dotado de estrangulamento, podemos improvisar um aparelho dêstes, uma vez que não se deseje uma alta precisão (45). Foi o que fizemos em nosso laboratório obtendo resultados razoáveis, usando como absorvente a solução a 1% (vide solução no fim do texto) de H_3BO_3 .

A técnica de difusão tem sido grandemente aperfeiçoada e atualmente os suécos estão conseguindo detectar com ela, nitrogênio na ordem de 0,005 microgramas (4).

Atualmente só as técnicas de espectrogramas eletrônicos, de HILLER, parecem poder detectar quantidades menores de N (13).

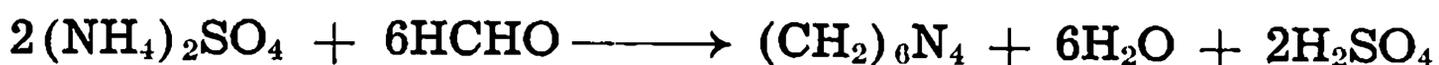
Deixando de lado estas técnicas de difusão, usadas somente em circunstâncias especiais em que se trabalha com amostras muito pequenas, da ordem de 0,1 mgr e até de 0,1 micrograma (laboratório Carlsberg), devemos tratar agora de outras que prescindem da fase de destilação.

Estas técnicas sacrificam a precisão em favor de razões práticas, podendo ser adaptadas a análises industriais e mesmo em pesquisas em que se não necessita de resultados tão acurados.

Trataremos em primeiro lugar da técnica de MARCALI e RIEMAN (27) que se baseia em uma observação de KOLTHOFF (22), segundo a qual o aldeido fórmico em presença de NH_3 dá origem a formação de hexametenotetramina, sendo a reação imediata.

Em linhas gerais o método é o seguinte:

Toma-se o material kjeldalizado e no próprio frasco de digestão neutraliza-se o excesso de H_2SO_4 com soda 10 N, usando o vermelho de metila como indicador. Após a viragem do indicador, junta-se com a bureta, H_2SO_4 N até que êle volte à côr primitiva. Em seguida com soda 0,1N titula-se até a viragem do vermelho de metila e nota-se o resultado. Junta-se então a solução neutra de aldeido que forma a hexametenotetramina.



O indicador volta à cor primitiva em virtude da presença do H_2SO_4 conforme a equação acima. Continua-se a titulação até o vermelho, juntam-se depois gotas de fenolftaleína e vai-se até a viragem deste indicador, anotando-se também este segundo resultado. O NH_3 é dado pela diferença entre a 1.^a e a 2.^a titulação.

Observou-se que nos casos em que as amostras continham fosfatos os resultados não eram bons, sendo então necessária uma modificação devida a MARCALI (26).

Cumpra observar que neste método deve-se usar como catalizador um sistema de K_2SO_4 e HgO tendo-se o cuidado de cindir os complexos amônio-mercúricos formados. Para isso MARCALI recomenda o uso de $NaBr$ no lugar de tiosulfato. No caso de amostras contendo fosfatos, depois do $NaBr$ junta-se cloreto de zirconila, que acarreta com todo o fosfato sob a forma de fosfato de zirconila, dilui-se a solução em um frasco volumétrico, filtra-se e dosa-se o N numa parte alíquota pela técnica geral de MARCALI e RIEMAN.

Outra técnica que dispensa também a destilação foi a desenvolvida por HAANAPPEL (11) que se baseia na oxidação do NH_3 formado durante a digestão pelo Br.



deslocamento do I de um iodeto, pelo Br e titulação pelo tiosulfato.

Damos em seguida um resumo da técnica recomendada:

Toma-se o material kjeldalizado, dilui-se para 50ml, junta-se 20ml de solução a 4% de borax para tamponar e depois 25ml de solução 0,1N de hipobromito. Adiciona-se 10ml de solução N de KI e 5ml de HCl 4N. O iodo liberado é titulado com tiosulfato. Outra técnica que cada vez mais sendo mais empregada é a da nesslerização direta do material digerido, si bem que variadas causas de erro possam influir nos resultados obtidos com este método. Em todo caso com material bastante conhecido e com uma escolha conveniente de uma técnica padrão (desde a digestão até a escolha do filtro) o método pode ser empregado com exito.

A principal causa destes erros está na formação de aminas (9) segundo a opinião de KIRK (16). É interessante para quem pretende trabalhar no método a leitura do artigo de LEITCH (24), sobre estas causas de erro.

Em resumo o método é bom, mas requer uma demorada fase de padronização e escolha de técnica para cada caso.

Resta-nos tratar da determinação do NH_3 distilado e absorvido em soluções ácidas. Já vimos que no método de VARRENTRAP (12) o NH_3 era determinado sob a forma de cloro-platinato. VILLIERS (51) determinou-o gravimetricamente após cuidadosa secagem do cloreto de amônio, resultante da absorção em HCl .

Estes métodos, entretanto, apesar de muita precisão são pouco práticos. Desde os primeiros tempos usou-se a determinação por acidi-

metria (como foi introduzido por PELIZOT (12) dosando-se com soda padrão o excesso de um volume determinado de ácido sobre o NH_3 absorvido. O indicador usado deve ter viragem em pH ácido porque sendo o NH_4Cl um sal ácido a neutralização se faz em pH um pouco abaixo de 7. O indicador adotado foi o vermelho de metila. Mais tarde com o aparecimento da absorção com H_3BO_3 começou a ser usada a mistura de vermelho de metila e azul de metileno (6) até que foi definitivamente adotado o indicador vermelho de metila-verde de bromo-cresol (56).

Além da titulação por simples acidimetria, a primitiva técnica de iodometria recomendada por KJELDAHL (48) é também bastante usada e tem uma boa precisão. Dos trabalhos que lemos a respeito desta técnica nos pareceu mais ilustrativo o de TEORELL (44) que além de uma resenha histórica apresenta um extenso estudo experimental. Em linhas gerais o método baseia-se na oxidação do NH_3 pelo Br (hipobromito), deslocamento do I pelo Br, de um volume determinado de uma solução de iodeto e determinação deste iodo deslocado, pelo tiosulfato.

Esta técnica pode ser empregada com ótimos resultados segundo os autores que com ela trabalharam.

Temos ainda por fim as técnicas colorimétrica como as do fenato de Na (47) de VAN SLYKE e HILLER, as de BORSOOK (2) baseada na reação do hipobromito com o NH_3 e o ultramicrométodo de KIRK (19), adaptando um tubo colorimétrico capilar ao espectrofotômetro de BECKMAN.

Por último podemos falar ainda na técnica de TAYLOR (43) que consiste na determinação pelo potenciômetro, do pH em que fica a solução de H_3BO_3 depois da absorção do NH_3 .

A técnica que usamos como rotina, apesar de não ser tão precisa como as de difusão, é suficientemente boa para ser adotada em dosagens do N para pesquisas biológicas. Por este motivo damos a descrição mais detalhada do método com o qual temos obtido resultados satisfatórios, em cerca de 500 análises realizadas.

Trabalhamos em geral com amostras contendo de 0,14 a 0,70 mgr de N obtendo um desvio padrão igual a 0,0007 mgr, com erros portanto que vão de 0,1 a 0,5%.

A grande maioria destas dosagens foi feita em homogenizado de fígado de rato. Ora eram homogenizados totais diluídos, contendo 4mg do material original por ml, ora resíduos de diferentes técnicas de extração a partir de 100mg do material. Técnicas estas levadas a efeito pelo Dr. GILBERTO G. VILLELA (50). Outros materiais com que trabalhamos (ácidos nucleicos, caseína, sôro, etc.) não apresentaram dificuldades dando sempre bons resultados. Somente nos casos de N em anél a técnica de rotina não dava resultados aceitáveis, mas isto, como já dissemos será objeto de um outro trabalho.*

* Vide nota no rodapé da pag. 4.

Descrição da técnica seguida:

Toma-se o material no frasco de KJELDAHL, em amostras de 0,14 a 0,70 mgr e volume não maior que 4 ml, junta-se 1 ml de H_2SO_4 concentrado e 5 gotas da solução de catalizador. Deixa-se eliminar toda a água e então aumenta-se a intensidade da chama para a kjeldalização que se faz rapidamente na maioria dos casos. Depois que o material está claro, deixa-se ainda sob fogo direto e intenso durante 20 a 30 minutos.

Deixa-se esfriar, dilui-se em alguns mililitros de água destilada e adapta-se o frasco ao aparelho de destilação (nossos frascos de digestão são adaptáveis diretamente ao destilador, diminuindo desta maneira as perdas na transferência do material, sendo ainda todas as conexões do aparelho, de vidro esmerilhado). Adaptado o frasco ao aparelho, liga-se a água ao refrigerante e adapta-se à outra extremidade o tubo de condensação que mergulha na solução absorvente de H_3BO_3 (5ml) em um balão erlenmeyer.

Junta-se então cerca de 4ml de soda 10N pelo tubo de segurança, passando-se depois 1ml de água destilada pelo mesmo. Em seguida liga-se o compressor a 40 libras de pressão, ligando o ar ao tubo de segurança depois de lavá-lo em solução a 25% de H_2SO_4 para eliminar o NH_3 atmosférico. Acendemos em seguida o bico de Bunsen, e destilamos então o NH_3 com borbulhamento de ar.

O aquecimento só se faz para apressar o processo pois a simples aeração é suficiente, se bem que demore 1 hora ou mais (21). Com o duplo efeito do borbulhamento e aquecimento podemos considerar completa a destilação em 30 minutos se bem que entre 5 e 10 minutos já 90% se tenha destilado.

A titulação é feita com bureta graduada em décimo de ml, dando o centésimo nas pequenas graduações, com HCl 0,01N; e deve ser feita imediatamente após a destilação pois com a demora há uma pequena perda que se estabiliza depois de 1 hora.

Diferentes destilações e titulações devem-se fazer com um padrão de sulfato de amônio, até se acertar bem a viragem e a técnica de destilação (tempo, intensidade da chama e borbulhamento). Para os casos a que já nos referimos de substâncias contendo nitrogênio em anel devemos usar além do catalizador de Se, um pouco de HgO que forme os compostos amônio-mercúricos, com o NH_3 previndo assim as perdas por formação de N^2 e de aminas.

Nestes casos temos que usar não a soda 10N para deslocar o NH_3 , mas contendo 5% de tiosulfato ou Na_2S . Na maioria dos casos obtivemos sucesso juntando 0,5ml da solução de HgO .

O desvio padrão do método foi calculado com a dosagem de uma mesma amostra, com os seguintes resultados:

		d		d ²	
	2.240 ml	—	0.002 ml	—	0.000004
	2.210 "	—	0.028 "	—	0.000784
	2.250 "	+	0.012 "	—	0.000144
	2.250 "	+	0.012 "	—	0.000144
	2.240 "	—	0.002 "	—	0.000004
	m = 2.238				0.001080

desvio padrão =

$$\sqrt{\frac{0.001080}{4}} = 0.0051 \text{ ml de HCl } 0,01\text{N}$$

$$0.0051 \text{ ml} \times 0,14 \cong 0.0007 \text{ mg}$$

Catalizadores

- 1)

CuSO ₄	—	22g
K ₂ SO ₄	—	7g
SeO ₂	—	1g

Tomar 2gr/250ml com 5ml de H₂SO₄ concentrado.

- 2) *Catalizador para N em anel*

0.03gr de HgO/100ml com 3ml H₂SO₄ concentrado.

Soluções

- 1) Solução de NaOH 10N
 2) " " " 10N com 5% de tiosulfato
 3) " " HCl 0.01N

- 4) *Solução de ácido bórico (segundo CONWAY)*

Ácido bórico (C.P.) — 10g
 Álcool — 200ml
 Água — 700ml
 Indicador — 10ml

Alcalinizar com gotas de soda até "light red" (roseo). Completar para 1000ml.

- 5) *Indicador*

Verde de bromocresol — 0.033%
 Vermelho de metila — 0.066%
 Ambos em álcool.

Conclusões.

É desnecessário falar na importância da dosagem do N em pesquisas biológicas e bioquímicas. O método clássico de DUMAS exige sempre técnicas e aparelhagem muito delicadas, além de ser demorado. Daí o empenho no desenvolvimento do método de KJELDAHL com técnicas cada vez mais precisas.

De um modo geral, as dificuldades do método de KJELDAHL estão localizadas na digestão dos diferentes materiais e principalmente nos heterocíclicos (ring N).

Agradecimento.

Agradecemos ao Prof. GILBERTO VILLELA as sugestões apresentadas e as facilidades oferecidas na realização deste trabalho e ao Dr. JUVENAL DE ALMEIDA FILHO e pela leitura do original.

Sumário.

1. É feita uma revisão do método de KJELDAHL até 1950.
2. É dada a descrição de um método, trabalhando com amostras de material biológico contendo 0,14 a 0,70 mg de N. O desvio padrão encontrado foi de 0,0007 mg.

Summary.

1. The determination of organic nitrogen by the KJELDAHL method is reviewed up to 1950.

2. A method is described in which samples of biological material containing from 0.14 to 0.70 mg. N were employed. The accuracy of the obtained results was evaluated and their standard deviation was found to be 0.0007 mg.

Research is being carried out on kjeldahlization curves of different materials which is the object of a further paper.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BLOM, T. e SCHWARTZ, B. — Acta Chem. Scand. 3,1439,1949.
- 2 — BORSOOK, H. — J. Biol. Chem. 110,481,1935.
- 3 — BRADSTREET, R. B. — Ind. Eng. Chem. (anal. ed.) — 12,657,1940.
- 4 — BRÜEL, D., HALTER, H., LINDERSTROM-LANG, K. e ROZITS, K. — C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim. 25,289,1946.
- 5 — CONWAY, E. J. — Microdiffusion Analysis and Error, Crosby Lockwood & Sons, Ltd. — London, 1947.
- 6 — CONWAY, E. — Biochem. J. 36,655,1942.
- 7 — CONWAY, E. and BYRNE, A. — Biochem. J. 27,419,1933.
- 8 — DOYLE, W. L. and OMOTO, J. H. — Anal. Chem. 22,603,1950.
- 9 — GORTNER, R. A. e HOFFMAN, W. F. — J. Biol. Chem. 70,457,1926.

- 10 — GUNNING, J. W. — *Zeit. Anal. Chem.* 28,188,1889.
- 11 — HAANAPPEL, TH. A. G. — *Pharm. Weekblad.* 75,570,1938.
- 12 — HEPBURN, J. S. — *J. Frank. Inst.* 166,81,1908.
- 13 — HILLER, J. — *Phys. Rev.* 64,318,1943.
- 14 — ILLARINOW, W. W. e SOLOVJENA, N. A. — *Zeit Ana. Chem.* 100,328,1935.
- 15 — KAHANE, E. e CARRERO, J. G. — *An. Soc. Espan. Fis. Quim.* 33,864,1935.
- 16 — KIRK, P. — *Advances in Protein Chemistry*, vol. III, pg. 146 (1947).
- 17 — KIRK, P. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)* — 8,223,1936.
- 18 — KIRK, P. — *Anal. Chem.* 22,354,1950.
- 19 — KIRK, P., ROSENFELS, R. S. e HANAHAN, D. F. — *Anal. Chem.* 19,355,1947.
- 20 — KJELDAHL, J. — *Zeit. Anal. Chem.* 22,336,1883.
- 21 — KOLER, P. A. e GRAVES, S. S. — *J. Am. Chem. Soc.* 35,1594,1913.
- 22 — KOLTHOFF, I. M. — *Pharm. Weekblad* — 58,1463,1921.
- 23 — LAURO, M. F. — *Ind. Eng. Chem. (anal. Ed.)* — *Oil and Soaps*, 10,149,1933.
- 24 — LEICHT, J. L. — *J. Frank. Inst.* 245,355,1948.
- 25 — LOCKET, G. L. — *School Scien. Rev.* 98,60,1944.
- 26 — MARCALI, K. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)* — 20,381,1948.
- 27 — MARCALI, K. e RIEMAN, W. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)* — 18,709,1946.
- 28 — MICHAELIS, A. — *Zeit. Chem.*, 6,460,1870.
- 29 — MILBAUER, J. — *Chem. Abzor.* 11,193,208,233,1936 e 12,17,1937 e 13,25,1938.
- 30 — NEEDHAM, J. e BOELL, E. J. — *Biochem. J.* 33,149,1939.
- 31 — NEUMAN, R. — *Chem. Zgt.* — 36,613,1912.
- 32 — OSBORN, R. A. e KRASNITZ, A. — *J. Ass. Off. Agr. Chem.* 17,339,1934.
- 33 — PARNAS, J. K. — *Acta Biol. Exptl.* 11,107,1937.
- 34 — PATEL, S. M. e SREENIVASAN, A. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)*, 20,63,1948.
- 35 — PETERS, J. P. e VAN SLYKE, D. D. — *Quantitative Clinical Chemical Methods*, pg. 519, 1932.
- 36 — QUARTAROLI, A. — *Ann. Fac. Agr. Univ. Pisa*, 9,90,1948.
- 37 — ROSENTHALER, L. — *M. H. Lebensm Hyg.* 37,215,1946.
- 38 — SANDSTEDT, R. M. — *Cer. Chem.* 9,156,1932.
- 39 — SCAGLIARINI, S. e TORELLI, G. — *Gazz. Chim. Ital.* 51, ii 277, 1921.
- 40 — SREENIVASAN, A. — *Ind. J. Agric. Sc.* 4,546,1934.
- 41 — SREENIVASAN, A. e SADAVISAN, V. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)*, 11,314,1939.
- 42 — STOVER, N. M. e SANDIN, R. B. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)*, 3,240,1931.
- 43 — TAYLOR, W. M. H. e SMITH, G. F. — *Ind. Eng. Chem.* 14,437,1942.
- 44 — TEORELL, T. — *Acta Med. Scand.* 68,305,1928.
- 45 — TEMPKINS, E. R. e KIRK, P. L. — *J. Biol. Chem.* 142,477,1942.
- 46 — VAN SLYKE, D. D. et al. — *J. Biol. Chem.* 146,137,1942.
- 47 — VAN SLYKE, D. D. e HILLER, A. — *J. Biol. Chem.* 102,499,1933.
- 48 — VEIBEL, ST. — *Chem. Educ.* 26,459,1949.
- 49 — VICKERY, H. B. — *J. Ass. Off. Agr. Chem.* 29,358,1946.
- 50 — VILLELA, G. G. —
Ácidos Nucleicos do Fígado. Em Algumas Condições Experimentais.
Tese apresentada para concorrer à Cadeira de Química Fisiológica da
Faculdade de Medicina da Universidade do Brasil, 1951.
- 51 — VILLIERS, A. e MOREAU-TALON, A. — *Bull. Soc. Chim.* 23,308,1918.
- 52 — WAGNER, E. C. e MEEKER, W. — *Ind. Eng. Chem.* 5,396,1933.
- 53 — WICKS, L. E. e FIRMINER, H. I. — *Ind. Eng. Chem. (anal. ed.)*, 14,760,1942.
- 54 — WILFARTH, H. — *Chem. Zeit.* 16,17,1885.
- 55 — WINCKLER, L. W. — *Zeit. Angew. Chem.* 26,231.
- 56 — ZUAZAGA, G. e MA, T. S. — *Ind. Eng. Chem.* 14,280,1942.