

MICROANALISE EM TRABALHOS DE ROTINA: II - AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS*

Walter Brune
José Mário Braga
Cid Martins Batista
Dirceu Jorge da Silva**

1. INTRODUÇÃO

A avaliação global de proteínas freqüentemente é feita pelo processo Kjeldahl, que é uma das práticas analíticas mais antigas e difundidas. Os inconvenientes da técnica original foram superados, em grande parte, por modificações. Entre essas, uma das mais versáteis é a da microdifusão, conforme preconizada por Conway (4, 5). Realmente, essa modificação apresenta vantagens atraentes, pois ela substitui de modo simples a destilação no processo 'clássico', permite fazer repetições com uma só amostra de material digerido, requer amostras e reagentes em pequenas quantidades, não exige nem aparelhagem sofisticada, nem mão-de-obra relevante. Porém, para que o erro experimental não invalide os resultados, a microdifusão requer a consideração de alguns fatores.

Com o propósito de estudar a exequibilidade dessa técnica em análises de rotina, foi conduzido, no presente estudo, o método Kjeldahl, a fim de comparar entre si as particularidades analíticas da destilação, do arraste pelo vapor e da microdifusão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O método Kjeldahl (7), tal como é aplicado atualmente, é consequência de modificações sem conta, a fim de aprimorá-lo e adaptá-lo à natureza da amostra e seu tamanho (8). As modificações se referem em sua maior parte ao catalizador, à destilação e ao absorvente. O tamanho da amostra deu origem ao desenvolvimento de semimicro (1) e microanálises (2, 6, 9, 10). Os resultados obtidos em muitas das modificações são bem satisfatórios, e certamente se deve, em grande parte, a boa aceitação do método, desde sua publicação, em 1883, a essa precisão.

* Comunicação Rev. Ceres 20(112):474-87 (1973)

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM 22-04-1975.

** Respectivamente, Professores Titular e Adjuntos da U.F.V.

Uma vez digerida a amostra, a avaliação do amônio resultante por microdifusão pode ser levado a "... qualquer nível de exatidão..., sendo a aparelhagem necessária mais simples, e maior número de determinações pode ser conduzido com uma só amostra" (5).

Na contingência de poder conduzir análises rotineiras em nossos laboratórios, resolvemos optar por três modificações promissoras e compará-las por suas feições. São elas a macroanálise por destilação, a semimicroanálise por arraste de vapor e a microanálise por difusão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para testar as três modificações, analisamos material natural de teores supostamente bem diferentes em nitrogênio e de textura desigual. Não se deu atenção especial para definir a procedência, tipo ou linhagem desse material. Assim, foram analisadas amostras de milho, capim-elefante, sorgo, farelos de peixe e de soja, e duas amostras de solos. O teor de nitrogênio observado nas amostras de solo foi convertido, para uniformização, em 'proteína' pelo fator 6,25.

Todo o material foi homogeneizado por mistura (amostras de solo) ou moagem a 40 mesh (material vegetal).

3.2. Análise Química

3.2.1. Digestão e Transporte de Amoníaco

A amostra, entre 100 a 500 mg, foi digerida em balão Kjeldahl de vários tamanhos, com ácido sulfúrico, aprox. 5 ml. O catalizador consistiu de uma mistura de selênio elementar, sulfato de cobre e sulfato de sódio anidro ($0,8 + 1 + 100$), do qual foi aplicado cada vez uma 'ponta de faca'. A digestão levava uma hora, aproximadamente.

Na macroanálise, o amoníaco foi conduzido pelo modo convencional por basificação e distilação; na semimicroanálise, por basificação e arraste de vapor; e, finalmente, na microanálise por basificação e difusão em placas de Conway.

Em todos os ensaios o amoníaco foi recebido em solução de ácido bórico, contendo os indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol.

3.2.2. Titulação

Todas as titulações foram feitas com ácido clorídrico, cuja concentração variava entre 5 a 200 mM, de acordo com a técnica e conveniência do operador. A tolerância na escolha da concentração resultou de ensaios preliminares, onde percebemos que, em macro e semimicroanálises, o erro experimental depende muito mais de outros fatores do que da fixação da normalidade do ácido usado para a titulação. Em microanálises, entretanto, tornou-se conveniente conduzir a titulação com solução 5 mM, em consequência das pequenas quantidades analisadas.

Em razão disto, foram usadas, em microanálises, buretas com sensibilidade de 0,01 ml. Nas outras análises foi usado,

3.3. Avaliação Estatística

Todas as análises foram feitas com número variável de repetições. Para a comparação dos resultados foi calculado o Coeficiente de Variância (CV).

Em casos relativamente raros, um resultado, dentro de uma série de observações, parecia ser consequência de um descuido experimental, por exemplo pela contaminação da solução de ácido bórico com hidróxido de sódio. Em tais casos de suspeita, a série foi analisada matematicamente, a fim de que se pudesse julgar se a eliminação de definido resultado era estatisticamente lícita (3). O valor 'purificado', assim obtido é, no presente trabalho, denominado 'corrigido'.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três modificações em apreço foram testadas e julgadas individualmente, conforme segue.

4.1. Macroanálise

A análise foi conduzida com sementes de soja. As amostras tinham o peso de 100mg. Cada amostra foi analisada três vezes. Os resultados encontram-se no Quadro 1. O valor CV médio corrigido rendeu 4,2%.

QUADRO 1 - Teor em proteína de sementes de soja de várias linhagens, observado em macroanálise

Linhagem	Teor em proteínas*	CV %
1	10,16 ± 0,52	5,1
2	13,21 ± 0,79	6,0
3	9,20 ± 1,23	13,4
4	10,63 ± 0,52	4,9
5	12,88 ± 0,24	1,9
6	15,59 ± 0,49	3,1

* Os valores são médias de três ensaios.

4.2. Semimicroanálise

Foram feitos testes com vários materiais. Os resultados encontram-se no Quadro 2.

QUADRO 2 - Teor em proteína de vários materiais observados em semimicroanálise

A M O S T R A

Material	Peso médio (mg)	Nº de linhas-agens	Nº de repetições	Teor %	CV %	Operador
Milho	500	1	10	11,3	4,85	A
Sorgo	280	6	2	8,10 a 13,6	2,12	B
Sorgo	240	5	2	8,56 a 13,5	1,42	C
Sorgo	230	1	9	11,1	1,01	C
Sorgo	280	6	4	9,10 a 13,8	1,81	C
Vários*	280	4	2	1,16 a 60,9	0,74	B
Vários	450	4	3	1,26 a 61,6	2,15	C
Capim-elef.	210	6	2	3,38 a 8,73	2,91	B
Capim-elef.	210	6	2	3,28 a 8,72	1,27	C

* Farinha de soja, farinha de peixe e dois tipos de solo.

Percebem-se diferenças características entre os valores CV em função do operador. O valor médio, considerando o número de amostras, foi de 1,88%. Este valor parece ser característico para semimicroanálises executadas com o material entre 200 a 500 mg e com teores de proteína que variam entre 1 a 60%.

4.3. Microanálise

Os ensaios por difusão foram conduzidos com alíquotas que continham mais ou menos 3% do teor em amônio das amostras usadas em macroanálises e semimicroanálises. Considerando as cautelas que assim se tornaram necessárias, conforme observado em ensaios preliminares, usamos micropipetas Eppendorf. Ainda em consequência da sensibilidade da resposta, a atmosfera do laboratório deve estar livre de amoníaco. Percebemos, também, que não é conveniente aplicar ácido para titulação, com teor expresso em normalidade. A padronização do ácido, ao contrário, é feita com vantagem a partir de solução de sulfato de amônio, informando assim sobre a equivalência entre o volume de ácido gasto e o teor em amônio da parte alíquota. Em definido experimento, conduzido com solução 70,0 mg de sulfato de amônio em 100,00 ml de solução aquosa foi obtida a seguinte relação:

$$s = 0,453 h + 0,021 \text{ (número de titulações: 63)}$$

onde 's' representa o volume da solução de sulfato, em ml, e 'h' o volume de ácido clorídrico, em ml, gasto na titulação. A representação gráfica (Figura 1) dá uma ilustração do erro experimental, que foi estimado em $CV = 2,29\%$.

Aplicando a microanálise a grãos e folhas de sorgo, conduzida sempre pelo mesmo operador, ficou claro que a ausência com-

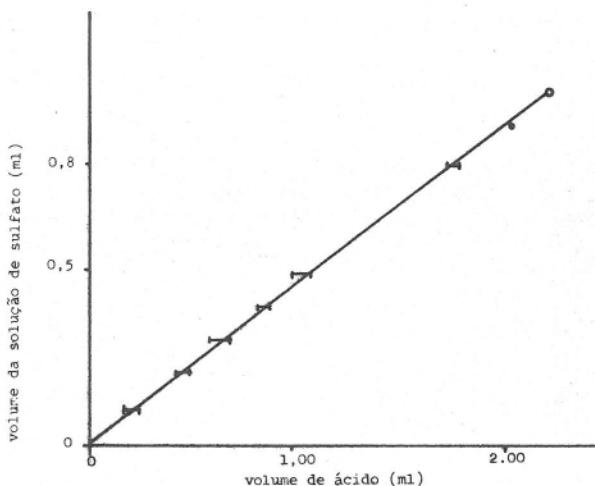


FIGURA 1 - Equivalência entre sulfato de amônio (700 mg.L^{-1}) e ácido clorídrico em microanálise.

pleta de amônio na atmosfera do laboratório é condição problemática. Para sua superação foi feita diariamente uma calibração com solução de sulfato de amônio e aplicada a necessária correção. Também revelou ser importante a destreza do operador, conforme já relatado na discussão dos resultados de semi-microanálise. Para demonstrar esse efeito, o analista conduziu as análises durante um período relativamente longo. Os valores CV foram avaliados mensalmente. O resultado se encontra no Quadro 3.

QUADRO 3 - Teor protéico em material de sorgo (grãos e folhas) observado em microanálises. O valor CV médio foi apurado mensalmente

Mês da análise	Teor médio %	Número de análises	Valor CV médio(%)
Julho	7,28	72	7,08
Agosto	11,80	92	4,00
Setembro	12,82	110	2,84
Outubro	10,70	201	1,71
Novembro	9,73	113	1,60

Esta tabela demonstra o efeito da destreza crescente do analista durante o trabalho de alguns meses. A Figura 2 compara o valor CV mensal com o tempo.

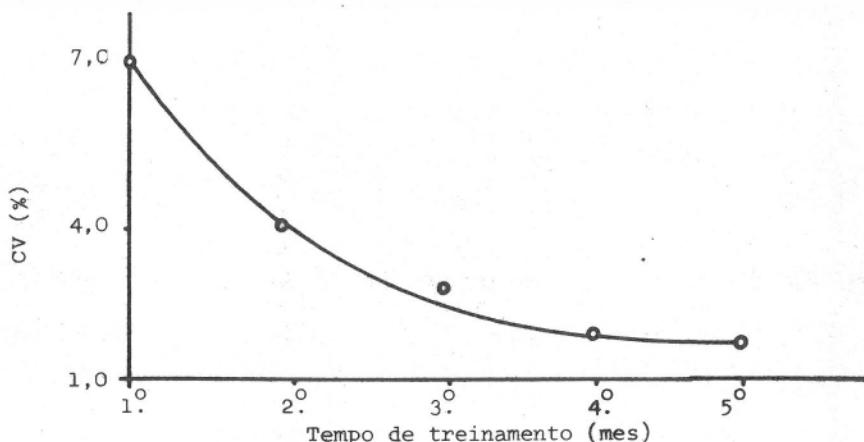


FIGURA 2 - Valor CV e tempo de aperfeiçoamento manual, conforme o treinamento em microanálises. Os ensaios são conduzidos por definido analista.

4.4. Análise Comparativa das Três Modalidades

Diversas linhagens de soja foram analisadas nas três modalidades, sendo executadas cada modalidade sempre pelo mesmo analista. A semimicroanálise foi executada duas vezes por analistas diferentes. Os resultados estão registrados no Quadro 4.

QUADRO 4 - Teor de proteína de linhagens de soja, observado por macro, semimicro (duas vezes) e microanálises. Cada modalidade de análise foi feita por analistas diferentes

Amos- tra	Macroanálise	Semimicroanálise		Microanálise
		I	II	
1	10,2 \pm 0,52	10,3 \pm 0,27	10,5 \pm 0,10	10,8 \pm 0,11
2	13,2 \pm 0,79	12,0 \pm 0,31	11,3 \pm 0,20	12,4 \pm 0,10
3	9,2 \pm 1,23	9,1 \pm 0,19	8,6 \pm 0,20	11,5 \pm 0,12
4	10,6 \pm 0,52	9,7 \pm 0,15	9,3 \pm 0,15	9,4 \pm 0,09
5	12,9 \pm 0,24	10,9 \pm 0,17	11,1 \pm 0,09	11,6 \pm 0,13
C.V. %		6,24	2,14	0,97
médio				
Nº de re- petições		3	3	2 e 9*
				12

* a amostra nº 5 foi conduzida com nove repetições.

Percebe-se na maior parte concordância nos resultados dentro dos limites experimentais. Dois resultados porém são discordantes:

Amostra 3; Semimicroanálise II e Microanálise

Amostra 5; Semimicroanálise I e Macroanálise

Atribuímos essas discrepâncias ao pequeno número de repetições.

Enfim, nas condições em que foram conduzidas as análises, a microanálise revelou vantagens sobre as outras duas modalidades em razão do erro experimental notadamente menor e pela facilidade de repetições a partir de uma só amostra digerida.

5. CONCULSÕES

As três modalidades de análise comparadas neste trabalho permitem tirar várias conclusões:

5.1 - Tamanho da amostra: Não há diferenças entre as três modalidades. A quantidade analisada depende do material disponível e do seu teor em proteínas.

5.2 - Quantidade de reagentes: A quantidade de ácido para digestão foi mantida aproximadamente igual na presente comparação sem que com isto resultasse qualquer desvantagem.

5.3 - O consumo de hidróxido de sódio é necessariamente maior nas macro e semimicroanálises. A diferença na quantidade de ácido bórico e indicadores é considerada irrelevante monetariamente.

5.4 - Aparelhagem: A aparelhagem bem mais onerosa é a da semimicroanálise.

5.5 - Enquanto que a macroanálise requer condensadores, placas aquecedoras, dispositivos para evitar a passagem da solução básica para o destilado, a microanálise requer placas, micropipetas e micropuretas.

5.6 - Consumo de Energia: Tanto a macro como a semimicroanálise requerem energia (geralmente elétrica) para sua execução. A microanálise não requer nenhuma fonte de calor.

5.7 - Tempo de análise: A digestão em todas as três modalidades leva o mesmo tempo, uma hora aproximadamente. O transporte do amôníaco requer bem mais tempo na microanálise. Enquanto que há quem fique satisfeito com um período de duas horas no máximo (4, 5) necessitávamos, conforme informação por ensaios preliminares, de tempo superior a 12 horas. Como medida de garantia levamos um dia para a difusão completa. A semimicro e macroanálise requerem no máximo uma hora para o transporte do amôníaco.

5.8 - Erro experimental: Admitindo-se analistas treinados, o erro experimental, de acordo com as nossas informações, é

consideravelmente menor em microanálise. Convém lembrar que o analista leva um tempo relativamente longo para familiarizar-se com as particularidades da microanálise. A semimicro e macroanálise são conduzidas com mais segurança.

5.9 - Outras particularidades: A microanálise requer muito mais tempo do que as outras modalidades e um ambiente controlado quanto ao teor em amoníaco da atmosfera. Porém, como costumeiramente se faz cada dia uma titulação em branco, essas três modalidades não diferem nesse particular. A grande vantagem que a microanálise leva sobre as outras duas, é a possibilidade de repetições em número elevado (mais que vinte, geralmente, sem muita mão-de-obra).

6. RESUMO

Foram comparadas analiticamente três modalidades do processo Kjeldahl, com o propósito de aplicá-lo para análise de rotina: Macroanálise, na qual o amoníaco foi conduzido por basificação e distilação. Semimicroanálise, na qual o amoníaco foi conduzido por arraste da vapor. Microanálise, na qual o amoníaco foi conduzido por difusão (Conway). Para efeitos de comparação foi analisado material entre 1 a 60% de proteína, mantendo-se sempre o tamanho das amostras na mesma ordem de grandeza (100 a 500 mg).

A diferença no consumo de reagentes não é relevante.

A aparelhagem da semimicroanálise é bem mais onerosa.

O erro experimental pode ser mantido bem mais baixo na microanálise. Em um experimento representativo, os coeficientes de variância oscilaram em torno de 6% (macroanálise), 2% (semimicroanálise) e 1% (microanálise).

O tempo necessário para a microanálise é maior, todavia a microanálise leva uma vantagem apreciável: permite fazer, sem muita mão-de-obra, repetições em número elevado a partir de uma só amostra digerida.

7. SUMMARY

Three forms of the Kjeldahl process were compared with one another to determine which would be most suitable for routine work: 'Macroanalysis', in which ammonium was distilled; 'Semimicroanalysis', in which ammonium was transported by vapor; and 'Microanalysis', in which ammonium was transported by diffusion (Conway).

During the analyses, using a variety of samples ranging from one to 60% of protein, it was realized that the consumption of reagents as well as the size of the sample do not serve to distinguish among the three forms.

The coefficients of variation in a representative series of the analyses were about 6% (Macroanalysis), 2% (Semimicroanalysis) and 1% (Microanalysis). Semimicroanalysis requires much more expensive equipment. Microanalysis requires the longest time, but has the advantage of permitting a fairly high number of repeated analyses of a single sample without requiring much handling.

8. LITERATURA CITADA

1. ARCHIBALD, R.M. Nitrogen by the Kjeldahl method. In: REINER, M. ed. *Standard methods of clinical chemistry*. New York, Academic Press, 1958. V. 2. P. 91-9.
2. BEACH, E. Nonprotein nitrogen. In: REINER, M. ed. *Standard methods of clinical chemistry*. New York, Academic Press, 1958. V. 2. P. 100-6.
3. CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. Waltham, Mass., Xerox College Publishing, 1971. 508 p.
4. CONWAY, Edward J. *Microdiffusion analyses and volumetric error*. New York, Chemical Publishing, 1963. 467 p.
5. CONWAY, Edward J. & O'MALLEY, E. Microdiffusion methods. Ammonia and urea using buffered absorbents. *The Biochemical Journal*, London, 36(7):655-61. 1942.
6. DOYLE, W.L. & OMOTO, J.H. Ultramicrodetermination of nitrogen. *Analytical Chemistry*, Washington, D.C. 22(4): 603-4. 1950.
7. IMPROVED Kjeldahl method for nitrate-containing samples. In: HORWITZ, William. ed. *Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemistry*. 11. ed. Washington, AOAC, 1970. cap. 2, p. 17(n. 2.052.).
8. KÖNIG, I.K. *Untersuchung von Nahrungs-, Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen*. 4. ed. Berlin, Springer Verl, 1910. 772 p.
9. KUCK, J.A.; KINGSLEY, A.; KINSEY, D.; SHEEHAN, F.; SWIGERT, G. F. Kjeldahl ultramicrodeterminant of nitrogen. *Analytical Chemistry*, Washington, D.C. 22(4):604-11. 1950.
10. PREGL, Fritz & ROTH, Hubert. *Die quantitative organische Mikroanalyse*. Berlin, Verlag Julius Springer, 1935. 328 p.