



NORMA TÉCNICA

L5.139

Jan/1978
10 PÁGINAS

Determinação de nitrogênio orgânico e de nitrogênio total Kjeldahl em águas - método da determinação de nitrogênio na forma de amônia: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

**DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO E DE
NITROGÊNIO TOTAL KJELDAHL EM ÁGUAS
MÉTODO DA DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO NA FORMA DE AMÔNIA**

CETESB

L 5.139

Decisão de Diretoria nº 281/2016/P, de 20/12/2016 - Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I), Edição nº 126 (239) do dia 22/12/2016 páginas: 100 a 102.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
1 OBJETIVO	1
2 REFERÊNCIAS	2
3 DEFINIÇÕES	2
4 APARELHAGEM	2
5 EXECUÇÃO DO ENSAIO	4
6 RESULTADOS	7
ANEXO A	9
ANEXO B	11

INTRODUÇÃO

Das formas bioquimicamente interconversíveis do ciclo do nitrogênio, as que tem maior interesse no estudo de águas e de águas residuárias são o nitrato, o nitrito, a amônia e o nitrogênio orgânico.

Nitrogênio orgânico é definido como aquele nitrogênio orgânicamente ligado e no estado de oxidação -3. Inclui materiais naturais tais como proteínas e peptídeos, ácidos nucleicos, uréia e substâncias orgânicas sintéticas. Ocorrem em águas naturais em concentrações de 10 µg/l ou menos, e em águas residuárias em concentrações superiores a 10 mg/l. Nos processos de tratamento biológico de águas residuárias as determinações de nitrogênio orgânico são feitas para verificar se a quantidade de nitrogênio presente é suficiente para o bom desenvolvimento dos microrganismos e para controlar os processos de aeração.

O método de determinação do nitrogênio orgânico é o da determinação desse nitrogênio em forma de amônia.

1 OBJETIVO

1.1 A presente Norma prescreve os métodos de determinação de nitrogênio orgânico e de nitrogênio total Kjeldahl em amostras de águas naturais em geral, águas de abastecimento, efluentes industriais e domésticos, águas de mar, lodos e sedimentos.

1.2 Os presentes métodos se aplicam para a determinação de nitrogênio orgânico ou total em concentrações superiores a 0,5 mg/l. Valores inferiores a 0,5 mg/l são duvidosos. Para valores superiores a 2,0 mg/l é feita a diluição da amostra.

2 REFERÊNCIAS

Deve ser consultada a seguinte Norma CETESB:

“Determinação de nitrogênio amoniacal em águas. Método da nesslerização com destilação prévia”.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as seguintes definições:

3.1 Nitrogênio orgânico

É o resultado da diferença entre nitrogênio total Kjeldahl e amônia livre. Pode ser determinado diretamente, por remoção preliminar da amônia da amostra antes da digestão.

3.2 Nitrogênio total Kjeldahl

É o resultado da soma da amônia livre e do nitrogênio orgânico. Pode ser determinado diretamente, sem remoção preliminar da amônia da amostra antes da digestão. O nitrogênio total Kjeldahl também é chamado simplesmente nitrogênio total.

4 APARELHAGEM

4.1 Vidraria, materiais e equipamentos

- 4.1.1 Pipetas volumétricas, tipo pyrex, classe A, volumes diversos.
- 4.1.2 Pipetas volumétricas, tipo pyrex, classe B, volumes diversos.
- 4.1.3 Pipetas graduadas, tipo pyrex, 10 ml, subdivisões 0,1 ml.
- 4.1.4 Provetas, tipo pyrex, 100 – 250 – 500 ml.
- 4.1.5 Pérolas de ebulição.
- 4.1.6 Balões volumétricos, tipo pyrex, classe A, 1000 ml.
- 4.1.7 Balões volumétricos, tipo pyrex, classe B, 250 ml.
- 4.1.8 Provetas, tipo pyrex, 100 ml, tampa de polietileno.
- 4.1.9 Aparelhagem de destilação:
 - balão Kjeldahl, tipo pyrex, 800 ml, fundo redondo, colo longo;
 - conexão Kjeldahl;
 - condensador reto, com ponta longa.
- 4.1.10 Espectrofotômetro, para uso a 420 nm.
- 4.1.11 Acessórios do espectrofotômetro:
 - tubos calibrados, 20 mm (ou 3/4”);
 - adaptador para tubos.

Nota: Ver em anexo uso e verificação do espectrofotômetro.

4.1.12 Chapa aquecedora para digestão.

4.1.13 Chapa aquecedora para destilação.

4.2 Reagentes

4.2.1 Água destilada isenta de amônia: preparar passando água recém-destilada por uma coluna de troca iônica contendo resina trocadora de cátions fortemente ácida e resina trocadora de ânions fortemente básica. Empregar resinas que removam compostos orgânicos que possam interferir com a determinação;

Alternativa: preparar acrescentando à água recém destilada 0,1 ml H_2SO_4 conc., p.a., por litro, e redestilando em seguida, descartando a primeira e a última porções de redestilado.

Nota 1: É praticamente impossível armazenar água destilada no laboratório sem contaminá-la com amônia. Por isso, preparar sempre uma quantidade que será consumida no mesmo dia.

Nota 2: Manter o frasco contendo água destilada isenta de amônia bem fechado e afastado de locais em que se trabalha com hidróxido de amônio e, quando em uso, deixá-lo na capela.

4.2.2 Tampão de borato: adicionar 88 ml de solução de NaOH 0,1 N a 500 ml de solução de borato de sódio 0,025 M (5,0 g $Na_2B_4O_7$, p.a., ou 9,5 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, p.a., diluídos a 1000 ml com água destilada isenta de amônia), e diluir a 1000 ml em balão volumétrico com água destilada isenta de amônia.

4.2.3 Solução de hidróxido de sódio 6N: dissolver 240 g NaOH, p.a., em 1 litro de água destilada isenta de amônia.

4.2.4 Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , conc., p.a.

4.2.5 Sulfato de potássio, K_2SO_4 , p.a.

4.2.6 Solução de sulfato mercúrico: dissolver 2 g de óxido mercúrico vermelho, HgO, p.a., em 25 ml de solução H_2SO_4 6N.

4.2.7 Reagente hidróxido de sódio-tiosulfato de sódio: dissolver 500 g NaOH, p.a., e 25 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, p.a., em água destilada isenta de amônia e diluir a 1 litro.

4.2.8 Solução de ácido bórico: dissolver 20 g H_3BO_3 , p.a., em água destilada isenta de amônia e diluir a 1 litro.

4.2.9 Reagente de Nessler:

- 1) Dissolver 61,75 g de iodeto de potássio, KI, p.a., em 200 ml de água destilada isenta de amônia;
- 2) Dissolver 180 g de hidróxido de potássio, KOH, p.a., em 250 ml de água destilada isenta de amônia;
- 3) Preparar uma solução saturada de cloreto de mercúrio, $HgCl_2$, p.a., a quente (aproximadamente 30 g/400 ml de água destilada isenta de amônia);
- 4) Pesar 0,75 g de iodeto de potássio, KI, p.a., em separado;
- 5) Adicionar (3) em (1), vagarosamente e com agitação, até precipitação do HgI_2 vermelho intenso. Dissolver o precipitado com (4). Adicionar (2) quando frio, e completar a 1000 ml com água destilada isenta de amônia;
- 6) Guardar em frasco ambar.

4.2.10 Solução-estoque de amônia:

dissolver 3,819 g NH_4Cl anidro, p.a., seco em estufa a 100°C por 2 horas, em água destilada isenta de amônia, e diluir a 1000 ml em balão volumétrico. 1,00 ml = 1,00 mg amônia em N.

4.2.11 Solução-padrão de amônia: diluir 10,00 ml da solução 4.2.10. a 1000 ml em balão volumétrico, com água destilada isenta de amônia. 1,00 ml = 10 μg amônia em N.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípios gerais

Existem variações do método, conforme o tipo de amostra, a saber:

Método A: Da remoção da amônia, digestão do material restante e determinação do nitrogênio orgânico na forma de amônia – aplica-se a amostras de águas naturais em geral, águas de abastecimento, efluentes domésticos e industriais e águas de mar.

Método B: Da determinação do nitrogênio orgânico por diferença entre os valores determinados para nitrogênio total Kjeldahl e nitrogênio amoniacal – aplica-se especialmente a amostras de lodos e sedimentos.

5.2 Interferentes

5.2.1 Interferem quantidades de N que contaminam a vidraria e que tem origem de outras fontes externas. Por isso, efetuar a destilação em ambiente separado, empregando vidraria pretratada para eliminar traços de nitrogênio.

5.2.2 O método deixa de incluir nitrogênio nas formas de azida, azo, hidrazona, nitrato, nitrito, nitrila, nitro, nitroso, oxima e semi-carbazona.

5.3 Coleta de amostras

5.3.1 As amostras para a determinação de nitrogênio total são coletadas em frasco de vidro ou plástico, e o volume necessário é 1000 ml.

5.3.2 As amostras não analisadas imediatamente são preservadas por até 7 dias pela adição de ácido sulfúrico até $\text{pH} < 2$ e refrigeração a 4°C .

5.3.3 As amostras para a determinação de Nitrogênio orgânico são coletadas em frasco de vidro ou plástico, e o volume necessário é de 1000 ml.

5.3.4 As amostras não analisadas imediatamente para determinar Nitrogênio orgânico são preservadas por até 24 horas pela adição de ácido sulfúrico até $\text{pH} < 2$ e refrigeração a 4°C .

5.4 Método A – Nitrogênio orgânico

5.4.1 Princípio do método: após a remoção da amônia por destilação, o nitrogênio orgânico é convertido em sulfato de amônio por digestão com ácido sulfúrico, sulfato de potássio e catalisador sulfato mercúrico. O material digerido é em seguida tratado com tiosulfato de sódio em meio alcalino, e a amônia resultante é destilada, recolhida em ácido bórico, e sua concentração é determinada espectrofotometricamente ou por titulação.

Nota: Para concentrações de N orgânico inferiores a 5 mg/l, a determinação espectrofotométrica é a mais indicada. Para outras concentrações a titulação é adequada, e a faixa de concentração é função do volume de ácido bórico empregado e da concentração do titulante.

5.4.2 Procedimento.

5.4.2.1 Ajuste do espectrofotômetro:

- a) Ligar o aparelho e permitir um aquecimento durante 20 minutos;
- b) Ajustar o comprimento de onda em 420 nm;
- c) Ajustar o zero, colocando o ponteiro em transmitância zero, sem tubo no instrumento e com a tampa fechada;
- d) Encher um tubo com líquido de referência (ver 5.4.2.2, "u", 5.4.2.3, "b" e 5.5.2.2, 5.5.2.3);
- e) Ajustar a transmitância em 100%.

5.4.2.2 Processamento da amostra:

- a) A destilação deve ser feita de preferência em capela, ou pelo menos em local afastado de locais em que são frequentemente abertos frascos de hidróxido de amônio. Evitar o desprendimento de vapores de amônia no laboratório. A digestão deve ser feita obrigatoriamente em capela;
- b) Pretratar a vidraria, colocando no balão Kjeldahl 500 ml de água destilada isenta de amônia, 20 ml de tampão de borato (4.2.2) hidróxido de sódio 6N (4.2.3) até pH 9,5 e pérolas de ebulição. Conectar o balão ao condensador e destilar a mistura até que o destilado recolhido não apresente traços de amônia. Deixar o sistema de destilação montado e com água destilada isenta de amônia no balão, enquanto o sistema não estiver em uso;
- c) Num balão Kjeldahl colocar 500 ml de amostra, ou um volume menor diluído a 500 ml com água destilada isenta de amônia, e ajustar o pH em 7 com solução de hidróxido de sódio 1N ou solução de ácido sulfúrico 1N;
- d) Acrescentar 25 ml de solução-tampão de borato (4.2.2);
- e) Acrescentar solução de hidróxido de sódio 6N (4.2.3) até pH = 9,5; verificar o pH;
- f) Colocar algumas pérolas de ebulição;
- g) Ferver para remover cerca de 300 ml de mistura;
- h) *Alternativa:* se foi feita a determinação de Nitrogênio amoniacal conforme a Norma CETESB L 5.136 – "Determinação de Nitrogênio amoniacal em águas", usar o resíduo do balão (do item 3.4.2.9) e prosseguir conforme os itens "i" até "u", que se seguem;
- i) Esfriar e adicionar, **COM CUIDADO**, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (4.2.4), 6,7 g de sulfato de potássio (4.2.5) e 1,5 ml de solução de sulfato mercúrico (4.2.6);
Nota: Se houver grande quantidade de matéria orgânica isenta de nitrogênio na amostra, adicionar quantidades maiores, porém proporcionais, de ácido sulfúrico concentrado, sulfato de potássio e sulfato mercúrico.
- j) Misturar, e aquecer até fumos brancos de SO₃, e continuar a ferver até que a solução se torne límpida (incolor ou amarelada). O aquecimento deve ser feito em capela ou em ambiente com exaustão adequada;
- k) Digerir por mais 30 minutos, também em capela ou em ambiente adequado. Esfriar, diluir a 500 ml com água destilada isenta de amônia (4.2.1) e adicionar 0,5 ml de solução de indicador fenolftaleína;
- m) Adicionar, **COM CUIDADO E PELAS PAREDES**, uma quantidade suficiente de reagente hidróxido-tiosulfato (4.2.7) para formar uma camada alcalina no fundo do frasco. (50 ml para cada 10 ml de ácido sulfúrico empregado na digestão);

- n) Conectar o frasco ao sistema de destilação previamente limpo, misturar, testar mais uma vez a mistura com fenolftaleína, acrescentar mais reagente hidróxido-tiosulfato (4.2.7) se a mistura não apresentar cor rósea com fenolftaleína;
- o) Destilar à velocidade de 10 ml/minuto, mantendo a ponta do condensador imersa na solução de ácido bórico (4.2.8) (50 ml da solução de ácido bórico em balão volumétrico de 250 ml). Não deixar a temperatura no condensador ultrapassar 29°C;
- p) Interromper a destilação quando faltarem 5 – 10 ml para o volume do destilado atingir a marca de 250 ml;
- q) Retirar a ponta do condensador acima do nível da solução, desconectar o condensador, lavá-lo com água destilada isenta de amônia (4.2.1) até atingir a marca de 250 ml;
- r) Tomar 100 ml do destilado em proveta com tampa de polietileno, neutralizar com solução de hidróxido de sódio 6N (4.2.3);
- s) Adicionar 2 ml de reagente de Nessler (4.2.9) e homogeneizar;
- t) Após 30 minutos, transferir um pouco da solução reagida para o tubo de 3/4", e ler a % transmitância no espectrofotômetro a 420 nm, ajustando 100% T com a prova em branco;
- u) Efetuar uma prova em branco, procedendo com 500 ml de água destilada conforme os itens "a" até "t", utilizando-a para ajustar o aparelho em transmitância 100% (ver 5.4.2.1, d);
- v) Correr 2 padrões com cada lote de amostras, para verificar a validade da curva padrão.

5.4.2.3 Construção da curva-padrão:

- a) Preparar soluções-padrão de várias concentrações de N, fazendo diluições da solução-padrão 4.2.11 em balão volumétrico, conforme a Tabela 1:

TABELA 1 – Preparo de soluções-padrão

Concentração em N mg/l (orgânico ou total)	ml de solução 4.2.11 a elevar a 1000 ml com água destilada 4.2.1
0 (branco)	0
0,2	20
0,4	40
0,8	80
1,2	120
1,6	160
2,0	200

- b) Tratar 500 ml de cada uma destas soluções-padrão conforme os itens 5.4.2.2, a, b, c, f, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s e t, ajustando 100% T com o branco (ver 5.4.2.1, "d");
- c) Construir uma curva % Transmitância x mg/l N, utilizando papel monolog, e a partir desta curva elaborar uma Tabela % Transmitância x mg/l N.

Nota 1: A curva de calibração vale para um determinado aparelho, e deve ser feita nova curva cada vez que forem preparados ou utilizados novos reagentes ou for feita alguma alteração no aparelho.

Nota 2: Opcionalmente pode-se fazer a regressão linear dos pares absorbância/concentração, e com a equação obtida elaborar uma Tabela.

5.5 Método B – Nitrogênio total Kjeldahl

5.5.1 Princípio do método: o nitrogênio da amostra é convertido em sulfato de amônio, sem prévia remoção de amônia, por digestão com ácido sulfúrico, sulfato de potássio e sulfato mercúrico. O material digerido é em seguida tratado com tiosulfato de sódio em meio alcalino, e a amônia resultante é destilada e recolhida em ácido bórico, tendo sua concentração determinada espectrofotometricamente ou por titulação.

5.5.2 Procedimento.

5.5.2.1 Ajuste do espectrofotômetro: proceder conforme 5.4.2.1.

5.5.2.2 Processamento da amostra: proceder com a amostra de água ou com uma porção pesada de lodo úmido suspensa em 500 ml de água destilada conforme 5.4.2.2, itens a, b, c, f, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t e v; efetuar uma prova em branco procedendo com 500 ml de água destilada conforme 5.4.2.2, itens a, b, c, f, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s e t, utilizando-a para ajustar o aparelho em 100% T.

5.5.2.3 Construção da curva-padrão: proceder conforme 5.4.2.3.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 Método A – Nitrogênio orgânico

$$\text{mg/l N orgânico} = \frac{\text{mg N} \times 200 \times V_D}{V_{AM} \times V_N}, \text{ onde:}$$

mg N é obtido da curva

V_D = volume de destilado, em ml

V_{AM} = volume de amostra, em ml

V_N = volume para nesslerização, em ml

Nota: A partir deste resultado:

$$\text{mg/l N total} = \text{mg/l N orgânico} + \text{mg/l N amônia}$$

6.1.2 Método B – Nitrogênio total Kjeldahl

$$\text{mg/l total} = \frac{\text{mg N} \times V_D \times 200}{V_{AM} \times V_N}, \text{ onde:}$$

mg N é obtido da curva

V_D = volume de destilado, em ml

V_{AM} = volume de amostra, em ml

V_N = volume para nesslerização, em ml

Nota: A partir deste resultado:

$$\text{mg/l N orgânico} = \text{mg/l N total} - \text{mg/l N amônia}$$

6.2 Precisão e exatidão

6.2.1 Conforme "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 14ª edição, foi determinado nitrogênio orgânico em 3 amostras pelos Métodos A e B. As composições das amostras e os resultados encontrados estão na Tabela 2:

TABELA 2 – Precisão e exatidão na determinação de N orgânico

Amostra	Composição mg/l	Nº de Laboratórios	Desvio-padrão relativo %		Erro relativo %	
			Método A	Método B	Método A	Método B
1	N org 0,2 Cloreto 400 N-NH ₄ 1,50 N-NO ₃ 1,0 Fosfato 0,5 Sfílica 30	26	94,8		55,0	
		15		68,8		70,0
2	N org 0,8 Cloreto 200 N-NH ₄ 0,8 N-NO ₃ 1,0 Fosfato 5,0 Sfílica 15,0	26	52,1		12,5	
		16		52,6		8,7
3	N org 1,5 Cloreto 10 N-NH ₄ 0,2 H-NO ₃ 1,0 Fosfato 10,0 Sfílica 5,0	26	43,1		9,3	
		16		45,9		4,0

ANEXO A – USO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

A-1 Uso adequado e cuidados com o espectrofotômetro.

A-1.1 Reajustar a transmitância 100% cada vez que for mudado o comprimento de onda.

A-1.2 Antes de passar para outro comprimento de onda, girar o botão controle de luz em sentido anti-horário.

A-1.3 Quando se operar a um comprimento de onda fixo durante um longo período, verificar ocasionalmente o ajuste em 100%.

A-1.4 Os tubos calibrados devem ser manuseados com cuidado para não riscá-los.

A-1.5 Os tubos calibrados devem ser lavados com detergente comum, enxaguados com água e água destilada e secos na estufa. Tubos em uso há muito tempo podem ser limpos com mistura sulfocrômica.

A-2 Verificação do desempenho do espectrofotômetro.

A-2.1 Verificar ocasionalmente o seletor de comprimento de onda, procedendo conforme instruções constantes do manual do aparelho, a saber:

- Colocar o seletor em 500 nm, sem tubo no aparelho e com a tampa fechada;
- Ajustar o zero;
- Colocar no aparelho um tubo com água destilada, fechar a tampa e ajustar a transmitância em 100%;

– Substituir a água destilada por uma solução de cobalto, e ler a % transmitância.

Solução de cobalto – Dissolver 22 – 23 g CoCl_2 p.a. em ácido clorídrico 1% e completar o volume até 1000 ml, em balão volumétrico, com ácido clorídrico 1%;

– Repetir os itens anteriores para 505, 510, 515 e 520 nm.

O seletor está em ordem se a % transmitância, entre 505 e 515 nm, for menor.

A-2.2 Verificar ocasionalmente a escala.

- Colocar o seletor em 510 nm, sem tubo no aparelho e com a tampa fechada;
- Ajustar o zero;
- Colocar no aparelho um tubo com água destilada, fechar a tampa e ajustar a transmitância em 100%;
- Substituir a água destilada por uma solução de cobalto e ler a absorbância (A_1);
- Diluir a amostra com igual volume de água destilada e ler a absorbância (A_2);
- Diluir a amostra diluída com igual volume de água destilada e ler a absorbância (A_4).

A escala está correta se $A_4 = \frac{A_2}{2} = \frac{A_1}{4}$

ANEXO B – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1** AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 13 ed. New York, APHA, AWWA, WPCF, 1971.
- B-2** AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14 ed. New York, APHA, AWWA, WPCF, 1975.
- B-3** ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – *Manual of methods for chemical analysis of water and wastes*. Washington, EPA, Office of Technology Transfer, 1974. (EPA-625/6-74-003).
- B-4** ENVIRONMENTAL CANADA – Water Quality Branch – *Analytical methods manual*. Ottawa, 1974.
- B-5** SAWYER, C.N. & Mc CARTY, P.L. – *Chemistry for sanitary engineers*. 2 ed. New York, Mc Graw – Hill Book Co., c 1967. (Series in Sanitary Science and Water Resources Engineering).
- B-6** BOLTZ, D.F. – *Colorimetric determination of monometals*. New York, Interscience Publishers, 1958.
- B-7** BAUSCH & LOMB – *Spectronic 20; colorimeter/spectrophotometer. Instructions*. 3 ed. New York, s.d.
-