

REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

MATERIAL VEGETAL E AS ROTINAS LABORATORIAIS NOS PROCEDIMENTOS QUÍMICO-ANALÍTICOS

LABORATORY ROUTINE FOR CHEMICAL AND ANALYTICAL PROCEDURES ON PLANT TISSUES

Ana Paula Lang MARTINS¹
Carlos Bruno REISSMANN²

RESUMO

Este texto, objetiva primariamente, atender o corpo discente envolvido em trabalhos acadêmicos, pesquisas científicas, dissertações e teses que, em função do curto período de permanência em suas atividades no curso, carecem de metodologias com desenvolvimento detalhado da rotina de laboratório que os tornem auto-suficientes, em suas análises, a despeito dos vários manuais publicados. O mesmo contém informações básicas sobre limpeza de vidrarias, preparação da amostra e leitura em vários equipamentos. Também mostra didaticamente métodos de determinação de nutrientes em material vegetal, incluindo as transformações matemáticas das leituras, para unidades padronizadas. Descreve, ainda, métodos de obtenção de extratos por digestão via seca – incineração; via úmida – Kjeldahl, extrações com ácidos diluídos. Para as leituras das amostras são utilizadas técnicas de titulação, colorimetria, fotometria de emissão e espectrometria de absorção atômica. As referências bibliográficas, utilizadas como leitura complementar, auxiliam no direcionamento dos leitores a dados adicionais no caso de ser necessário um aprofundamento maior. Espera-se que as informações contidas nesse texto auxiliem os operadores na condução de suas análises pertinentes às metodologias explicitadas.

Palavras-chave: Metodologia; nutrientes; análise; digestão; laboratório.

ABSTRACT

The presented text has as main purpose support students and junior researchers in their laboratory work, e. g., thesis and dissertations. This is due considering that in this case, in special, the time dispended in the laboratory is generally short and not continuous. In this sense, it is necessary to present an operational laboratory method rich in specific details that normally are not considered in the methods available in the published literature enabling the operators to be auto sufficient. The descriptions contain basic information about glassware cleaning, sample preparation and readings in different equipments. It also presents the methods of nutrient determination in a didactic way for vegetable materials, including mathematical transformations of the readings, step by step, in the different equipments to standard units. Additionally, describes methods for dry digestion – incineration; wet digestion – kjeldahl, and diluted acid extractions. For sample readings, techniques as titration, colorimetry, flame photometry, and atomic absorption spectrophotometry are described also. The bibliography cited in the text is recommended for additional readings in cases where a deeper knowledge is required. It is expected that the information, presented in the text, will be useful for the operators in conducting their analyses while utilizing the described methods.

Key-words: Methodology; nutrients; analysis; digestion; laboratory.

¹M. Sc. Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, Rua dos Funcionários, 1540, 800035-050 Curitiba-PR, langmartins@terra.com.br;

²Dr., Prof. Sênior do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR, Rua dos Funcionários, 1540, 80035-050, Curitiba, PR. Email: reissman@ufpr.br.

INTRODUÇÃO

As etapas analíticas em um laboratório de nutrição de plantas requerem considerações em relação a várias medidas operacionais. Antes de iniciar as análises, as amostras devem ser preparadas de acordo com uma série de critérios.

A análise foliar é um procedimento analítico de diagnóstico que, além da aplicação nas áreas agrícolas e florestais para fins produtivos, encontra amplo espaço na pesquisa ambiental. A pesquisa nutricional propriamente dita é um procedimento que, segundo JONES JR. (1998), representa uma técnica que determina o teor do nutriente na matéria seca das plantas, ou elemento químico, de uma determinada parte da planta, normalmente representado pelas folhas. A interpretação dos teores de nutrientes encontrados nestes órgãos permite, através de diferentes métodos de interpretação, avaliar seu estado nutricional. Serve também para o cálculo da exportação de nutrientes por parte de uma cultura, analisando-se pormenorizadamente o material objeto da colheita ou, na agrostologia, para o cálculo da dosagem de sais complementares na alimentação de animais. Na pesquisa ambiental, a análise foliar, ou dos tecidos vegetais como um todo, permite que esta técnica seja aplicada na fitorremediação, através da seleção de plantas que possam minimizar impactos da poluição química, quer seja em ambiente aquático ou terrestre. Neste aspecto são selecionadas plantas com alto poder de extração de elementos químicos poluentes. Assim como no estudo da exportação de nutrientes por parte de uma cultura agrícola ou florestal, o produto da sua composição química pela biomassa exportada indica o conteúdo na respectiva biomassa. Nesse sentido a escolha do método analítico tem valor preponderante.

A correta interpretação dos dados não depende apenas de processos químico-analíticos avançados, mas também, de processos sistemáticos de coleta, manuseio, armazenamento e processamento. De acordo com BATAGLIA e SANTOS (2001) é por ocasião da amostragem que ocorrem os erros que mais dificultam uma interpretação correta dos resultados das análises químicas. Portanto, é fundamental que antes de se proceder a coleta de material para análise, tome-se conhecimento dos procedimentos corretos de amostragem foliar ou de diferentes tecidos, quer seja para avaliação do estado nutricional, quer para fins de investigação ambiental. Os cuidados no momento da amostragem do material foram bem descritos por NOGUEIRA e SOUZA (2005). Compreendem a discriminação cuidadosa de variedades ou espécies, plantas com sintomas e plantas sadias, idade fisiológica, ramos com frutos, enxerto e porta-enxerto e estado fitossanitário. Além de evitar a mistura de amostras dessas diferentes situações, deve-se evitar coletar amostras que sofreram adubação ou pulverizações recentes, bem como, amostras de plantas localizadas em estradas ou caminhos de movimento intenso. Complementarmente, JONES JR. (1998) enumera

condições de plantas a serem evitadas durante a amostragem: plantas que estiverem sob longo estresse climático ou nutricional, plantas danificadas mecanicamente ou por insetos, plantas que contenham tecido morto, plantas de bordadura ou sombreadas sob o dossel.

Na avaliação dos tecidos para fins nutricionais amostram-se partes da planta que reflitam a condição nutricional da planta por excelência. No caso da pesquisa ambiental, analisam-se partes ou o todo da planta que além de indicarem o estado nutricional desta, reflitam o ambiente em termos de poluição/contaminação.

Após a coleta, o material deve ser identificado e enviado o mais rápido possível para o laboratório. Se possível dentro de 24 horas. Pode-se armazenar o material fresco à temperatura de 5 °C, ou um pouco menos, para evitar a deterioração do tecido (JONES JR., 1998). Para a remessa das amostras, estas devem ser acondicionadas em cartuchos de papel, normalmente utilizados para o acondicionamento de alimentos. Estes são os que melhor se prestam para esse fim, tendo em vista estarem livres, a princípio, de contaminantes. Na sequência, serão descritos procedimentos rotineiros da análise foliar em laboratórios que utilizem as metodologias descritas nesse texto.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E PREPARO DAS AMOSTRAS

Primeiramente enxaguar os frascos para armazenagem do material ou dos extratos para análise, com água de torneira, em seguida deixá-los imersos por 24 h em uma solução aquosa de ácido clorídrico a 10% v/v (NOGUEIRA e SOUZA, 2005), devidamente identificada e armazenada em lugar seguro. Finalmente enxaguar três a cinco vezes com água deionizada. Para o preparo, todo cuidado é necessário sendo obrigatório o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), que inclui, dependendo do caso, óculos, luvas, máscara, jaleco e avental compatíveis. É fundamental tomar conhecimento dos riscos e ações remediadoras no caso de acidente com substâncias agressivas.

Para a limpeza de pipetas, buretas e balões volumétricos só devem ser usadas soluções de limpeza (HCl diluído e detergente 0,1 – 0,3%) à temperatura ambiente (STEYN, 1959). No caso da secagem destes materiais em estufa, a temperatura não deve ultrapassar 30 °C (HERRMANN, 1975).

Na utilização da vidraria, sempre antes do uso, é conveniente a ambientação das mesmas com a solução a ser utilizada, a fim de minimizar a contaminação.

O preparo do material segundo Jones Jr. e CASE (1990) e JONES JR. et al. (1990) citando vários trabalhos, implica na descontaminação, secagem e moagem. As amostras devem ser processadas o mais rápido possível após a coleta. Caso isso não possa ser efetuado de pronto, recomenda-se o transporte e o armazenamento sob condições de refrigeração. No

caso de serem estocadas, as amostras devem ser retiradas do freezer, onde podem ser armazenadas a -5 °C paulatinamente à medida que vão ser submetidas aos processos seguintes. A descontaminação pode ser feita lavando-se a amostra em uma solução aquosa a 0,1%-0,3% de detergente seguida de lavagem rápida em água pura a fim de evitar a remoção de elementos facilmente lixiviáveis como K e Cl. JONES JR. (1998) salienta que o uso do detergente requer que seja desprovido de fosfato. JONES JR. et al. (1990), citam trabalho de JACQUES et al.¹, em que a lavagem com água deionizada destilada em relação à água pura, resultou em menores teores de Fe em folha de sorgo. Por outro lado é possível supor que a água “pura” contivesse teores expressivos de Fe em sua composição. Se a água destilada ou deionizada remove algum elemento, pelo menos esta se caracteriza como um padrão fixo e as alterações seriam constantes. Portanto, convém que as lavagens sejam feitas com água deionizada. É importante estabelecer um tempo fixo para cada enxágüe, por exemplo, 20-30 segundos por amostra de cada vez (JONES JR, 1998). Apenas folhas frescas devem ser lavadas. Convém sempre usar luvas, pois o material poderá, eventualmente, conter resíduos tóxicos, ou estar contaminado. Após a lavagem, o material deve ser seco o mais rápido possível, na temperatura de 60 a 65 °C para conter reações enzimáticas, evitando assim, a alteração da amostra, preferencialmente até peso constante (NOGUEIRA e SOUZA, 2005). Dependendo do material isto é atingido de 24 a 48 horas em estufa de ventilação forçada, exclusiva para tecidos de plantas. Em seguida o material é moído à granulometria de 20 mesh, e antes de acondicionado, novamente seco à temperaturas compreendidas entre 65 a 90 °C. Acima de 70 °C é possível ocorrer decomposição térmica. WEETMAN e WELLS (1990) sugerem que as amostras sejam secas a 70 °C. A moagem ocorre tradicionalmente em moinhos do tipo “Wiley”, ou então, em moinhos de ágata ou moinhos de café com lâminas inox (WEETMAN e WELLS, 1990). Frascos de polietileno, preferencialmente esterilizados e higienizados são os mais adequados. Para as sucessivas secagens que deverão ser submetidos antes das pesagens, é preciso testá-los quanto a resistência às temperaturas as quais serão submetidos.

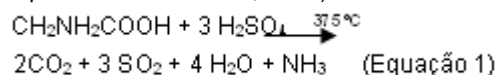
DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

DIGESTÃO VIA ÚMIDA

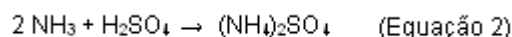
Nitrogênio: O nitrogênio no tecido vegetal é encontrado na forma orgânica integrando aminoácidos e proteínas. Por ocasião da análise é convertido a amônio através de uma digestão sulfúrica com auxílio de catalisadores como o K₂SO₄ e o CuSO₄ sob aquecimento em bloco digestor. Elementos como

¹JACQUES, G.L.; VANDERLIP, R.L.; WHITNEY, D.A.; ELLIS JR., R. Nutrient contents of washed and unwashed grain sorghum plant compared. Commun Soil Sci. Plant Anal., v. 5. p. 173-182, 1974.

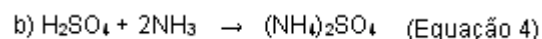
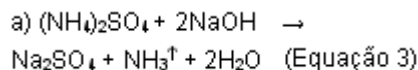
selênio e mercúrio também são utilizados, mas menos recomendáveis, tendo em vista o alto poder poluidor. Este método é conhecido como Kjeldahl e foi desenvolvido em 1883, descrito por BREMNER (1996) e KENKEL (1994). O nitrogênio orgânico é liberado através da fervura com ácido sulfúrico concentrado sendo hidrolisado com a ajuda de catalisadores (adaptado de STEUBING, 1965):



A amônia gerada na digestão é solúvel no ácido sulfúrico, dado em excesso, por se desconhecer seu quantitativo, converte-se em sulfato de amônio:



Posteriormente, o nitrogênio na forma amoniacal, é destilado na presença de hidróxido de sódio (Equação 3), e a amônia evoluída é novamente recebida em ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹ (HILDEBRAND et al., 1976).



O ácido sulfúrico remanescente é titulado com hidróxido de sódio diluído.

A determinação de N total tanto no tecido foliar como no solo é feita a partir do processo micro-kjeldahl. O procedimento analítico consiste em três etapas: digestão, destilação e titulação. Antes o material foliar deve ser higienizado (ver item 2). Na digestão pesa-se 0,5000 g da amostra previamente seca e moída, em tubos de digestão de 100 mL. Nestes são adicionados 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, catalisador (1 Sulfato de Potássio : 4 Sulfato de Cobre, ou o reativo de selênio) e duas esferas para digestão. Os tubos são levados para o bloco digestor, onde a temperatura é elevada 50 °C a cada uma hora até atingir 350 °C. A temperatura é mantida até que a coloração da solução fique com a tonalidade amarelada, ou predomine a cor do sulfato de cobre. Após o resfriamento, a solução é filtrada, para a retirada das esferas, em balão volumétrico de 100 mL e aferido com água deionizada. Na destilação são transferidos 25 mL da amostra digerida para tubo de “macro”, que sob aquecimento e recepção de NaOH 40% deverá liberar NH₃ com arraste de vapor. O NH₃ gerado será recebido em erlenmeyer contendo 20 mL de ácido sulfúrico 0,01 mol L⁻¹ e 3 gotas de indicador de misto. Após a destilação, a amostra é titulada com hidróxido sódio 0,02 mol L⁻¹ (Equações 3 e 4).

Preparo dos reagentes: O preparo e manuseio dos reagentes devem ser feitos em capela, com exaustão acionada, usando equipamento de segurança compatível.

a) Hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ (1 N): Pesas 40

g de NaOH e dissolver em béquer contendo aproximadamente 600 mL de água deionizada, transferir para balão de 1000 mL e completar o volume.

$$[\text{mol L}^{-1}] = \frac{m}{MM \times V(\text{L})}$$

$$1 = \frac{m}{40 \times 1}$$

$$m = 40 \text{ g}$$

(Equação 5)

Onde: m = massa, em gramas; MM = Massa Molar; V = volume, em litros

b) Hidróxido de sódio 0,02 mol L⁻¹ (0,02 N): pipetar 20 mL da solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, transferir em balão de 1000 mL, contendo aproximadamente 600 mL de água deionizada, e completar o volume.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1 \text{ mol L}^{-1} \times V = 0,02 \text{ mol L}^{-1} \times 1000 \text{ mL}$$

$$V = 20 \text{ mL NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$$

(Equação 6)

Onde: C₁ = Concentração inicial; C₂ = Concentração final; V₁ = Volume inicial; V₂ = Volume final

c) Ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (1 N): pipetar 27,74 mL de H₂SO₄ (conc.), transferir para um balão de 1000 mL, contendo aproximadamente 600 mL de água deionizada, e completar o volume. Considerando que o H₂SO₄ possui densidade ≈ 1,84 e apresenta 96% de grau de pureza, há a necessidade dos cálculos abaixo:

$$[\text{mol L}^{-1}] = \frac{m}{MM \times V(\text{L})} \quad d = \frac{m}{V}$$

$$0,5 = \frac{m}{98 \times 1} \quad 1,84 = \frac{49}{V}$$

$$m = 49 \text{ g} \quad V = 26,63 \text{ mL}$$

$$\begin{array}{rcl} 26,63 & \text{-----} & 96\% \\ V(\text{ mL}) & \text{-----} & 100\% \\ V & = & 27,74 \text{ mL} \end{array}$$

(Equação 7)

Onde: m = massa, em gramas; MM=Massa Molar; V = volume, em litros; d = densidade g mL⁻¹

d) Ácido Sulfúrico 0,01 mol L⁻¹ (0,02 N): pipetar 20 mL da solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, transferir em balão de 1000 mL contendo aproximadamente 600 mL de água deionizada e completar o volume.

$$C \times V = C \times V$$

$$0,5 \text{ mol.L}^{-1} \times V = 0,01 \text{ mol.L}^{-1} \times 1000 \text{ mL}$$

$$V = 20 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$$

(Equação 8)

Onde: C₁ = Concentração inicial; V₁ = Volume inicial; C₂ = Concentração final; V₂ = Volume final

e) Hidróxido de sódio 40% (SILVA, 1999): Pesar 400 g de NaOH e dissolver em béquer contendo aproximadamente 600 mL de água deionizada, transferir para balão de 1000 mL e completar o volume.

f) Indicador misto: pesar 0,5 g de verde de bromocresol e 0,1 g de vermelho de metila, dissolver ambos em álcool etílico a 95% (96 mL de álcool etílico e 4 mL de água deionizada).

Cálculo do fator H₂SO₄ / NaOH: O fator do H₂SO₄ deve ser 1. O fator do hidróxido de sódio deve ser calculado a partir da quantidade em mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ que foi adicionado no erlenmeyer e a quantidade de NaOH 0,02 mol L⁻¹ que se usa quando é feita a titulação.

Por exemplo: é feita a titulação com 20 mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ e foram consumidos 20,5 mL de NaOH 0,02 mol L⁻¹. Então o fator de conversão para o NaOH é:

$$f = \frac{20 \text{ mL do H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,01}{20,5 \text{ mL do NaOH } 0,02}$$

$$f = 0,9756$$

(Equação 9)

Isso quer dizer que a solução de NaOH não é exatamente 0,02 mol L⁻¹, mas sim,

$$0,02 \times 0,9756 = 0,019512 \text{ mol L}^{-1}$$

(Equação 10)

Exemplo de cálculo de determinação do nitrogênio em g kg⁻¹. A fórmula resumida para cálculo do nitrogênio total é a seguinte:

$$Nt = \frac{[20 - (tit. \times f)] \times 1,12}{p \text{ (g)}}$$

$$f = \frac{f}{b} \quad \text{(Equação 11)}$$

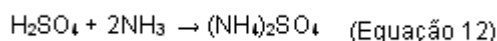
Onde: Nt = nitrogênio total (g kg⁻¹); tit. = volume de NaOH consumido na titulação (mL); p = peso da amostra (g); f = fator; b = volume de NaOH consumido na titulação (mL) do branco; 1,12 = constante para utilização de balão de 100 mL; 0,56 = constante para utilização de balão de 50 mL (ver Equação 17).

Se, por exemplo, após a titulação do destilado da amostra foi constatado um gasto de 15,73 mL NaOH "0,02 mol L⁻¹" é preciso levar em consideração a molaridade real do hidróxido. No entanto, a molaridade do hidróxido conforme constatado acima pelo fator é de 0,019512. Portanto, o consumo real foi de 15,35 mL de NaOH.

Subtraindo-se do volume de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ que recebeu o destilado, a quantidade de hidróxido consumida, tem-se a quantidade de amônia que neutralizou parte do H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ original: 20 mL H₂SO₄ - 15,35 mL NaOH = 4,65 mL (ver Equação 17)

Esse valor multiplicado por 1,12 e dividido pelo peso da amostra resulta na quantidade de nitrogênio expressa em g kg⁻¹.

Processo da neutralização do H₂SO₄: A neutralização do ácido sulfúrico deu-se da seguinte forma:



Para neutralização de 1 mol de H₂SO₄ são necessários 2 mol de NH₃. Conseqüentemente, para neutralização de H⁺ é preciso 1 mol de NH₃.

Sabendo que: 1 mol de NH₃ tem 1 mol de N
1 mol de H₂SO₄ tem 2 mol de H

(Equação 13)

Lembrando que: Uma solução de 1N de H₂SO₄ corresponde a 0,5 mol de H₂SO₄ em 1000 mL, e uma solução 0,02 N de H₂SO₄ corresponde a 0,01 mol de H₂SO₄ em 1000 mL.

Durante o processo de destilação utiliza-se 20 mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ no erlenmeyer que recebe o destilado da amostra. Portanto, em 20 mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ tem-se 0,0002 mol de H₂SO₄ que por sua

vez, tem 0,0004 mol de H⁺.

Sabendo-se que 1 mol de H⁺ pesa 1 g, 0,0004 mol de H⁺ pesa 0,0004 g (quantidade de H⁺ existente em 20 mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹).

Para a neutralização de 1 mol H⁺ é preciso 1 mol N na forma de NH₃ (Equação 13). Como 1 mol de N pesa 14 g, para a neutralização de 0,0004 g H⁺ é preciso 0,0056 g N (0,0004 x 14).

Os 20 mL de H₂SO₄ teriam sido neutralizados por 0,0056 g de N, se o NH₃ fizesse uma neutralização total de todos os mL de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹. Portanto, se 20 mL requerem 0,0056 g de N, os 4,65 mL neutralizados, do exemplo, teriam:

$$\begin{array}{l} 20\text{mL} \text{ ----- } 0,0056 \text{ g N} \\ 4,65 \text{ mL} \text{ ---- } \quad \times (\text{g N}) \end{array}$$

(Equação 14)

$$\times = \frac{0,0056 \text{ g} \times 4,65 \text{ mL}}{20 \text{ mL}}$$

Para facilidade dos cálculos é possível extrair uma constante dos valores fixos, em negrito, representados pelo volume de H₂SO₄ e a quantidade de nitrogênio existente:

$$\times = \mathbf{0,00028 \text{ g}} \times 4,65 \text{ ou, convertendo em mg,}$$

$$\times = \mathbf{0,28 \text{ mg}} \times 4,65$$

(Equação 15)

Considerando-se que a amostra digerida foi diluída em balão volumétrico de 100 mL e o volume usado na destilação foi de 25 mL, tem-se:

$$\frac{0,28 \times 4,65 \times 100}{25} = \mathbf{1,12} \times 4,65$$

(Equação 16)

No caso da diluição da amostra ser feita em balão de 50 mL, o valor do fator 1,12 é reduzido à metade: 0,56 (ver item 3.1.3).

No exemplo dado, o peso da amostra é de 0,5006 g. Portanto, de acordo com a fórmula (equação 11), o teor de nitrogênio é 10,40 mg g⁻¹, podendo ser expresso em g kg⁻¹, uma vez que a relação de ambos é partes por mil. Portanto:

$$Nt = \frac{[20 - (tit. \times f)] \times 1,12}{p \text{ (g)}}$$

$$Nt = \frac{4,65 \times 1,12}{0,5006} = 10,40 \text{ mg g}^{-1} = 10,40 \text{ g kg}^{-1}$$

$$Nt = 10,40 \text{ g kg}^{-1}$$

(Equação 17)

Digestão Nitro-perclórica - P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn: Um procedimento bastante utilizado é a digestão nitro-perclórica (JONES e CASE, 1990; TEDESCO et al., 1995; ZAGATO et al., 1981). No entanto, como são requeridas instalações especialmente planejadas para este fim (JONES e CASE, 1990), como por exemplo, capelas cujo sistema de iluminação e exaustão sejam à prova de explosão e provido de um filme de água corrente descendente ao longo da chaminé (OFFICE OF ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY, 2001), este processo não deve ser utilizado em laboratórios desprovidos dessas instalações. Neste sentido, como a escolha do método, além das considerações de precisão e exequibilidade, depende do equipamento e instalações adequadas, são eleitos métodos que dispensam tais condições como por exemplo, a digestão via seca (JONES e CASE, 1990), extratos sem digestão com ácido diluído (MIYASAWA et al., 1984).

DIGESTÃO VIA SECA – P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn

O princípio se baseia na queima da matéria orgânica resultando em cinza solúvel a ser diuída em ácido, geralmente clorídrico ou nítrico ou a combinação de ambos.

Para a digestão via seca, recomenda-se a pesagem de 0,5000 a 1,0000 g de material em cadinho de porcelana, que é colocado na mufla para incineração à 500 °C por 3 horas. (JONES e CASE, 1990). HILDEBRAND et al. (1976) recomendaram o retorno do cadinho à mufla por mais três horas, adicionado de aproximadamente 3 gotas de HCl 3 mol L⁻¹. É importante que a cinza do tecido assuma coloração cinza ou marrom claro, que indica combustão completa. Após este período e novo resfriamento, adicionam-se 10 mL de HCl 3 mol L⁻¹ e posicionam-se os cadinhos em chapa de aquecimento, sob exaustor, a aproximadamente 70-80 °C por 10 minutos, para solubilização total dos elementos (PERKIN e ELMER, 1973a).

Retira-se da chapa, deixa-se esfriar e filtra-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Normalmente o papel de filtro utilizado é o W42 ou SS 593³. Adiciona-se ao cadinho 10 mL de água deionizada, e retorna-se por 10 minutos para a chapa

de aquecimento (PAGEL et al., 1972). Continua-se a transferência, lavando-se intensivamente o cadinho e o papel de filtro com água deionizada até completar o balão volumétrico de 100 mL, cuidando para que não reste nenhum resíduo da amostra no cadinho. Após isto, transfere-se o filtrado para frascos de armazenagem. Esta solução apresenta uma concentração ácida final entre 0,2 a 0,3 mol L⁻¹, não sendo exata uma vez que o HCl é volátil mesmo a temperatura ambiente. Para o caso do fósforo, a concentração mínima requerida de ácido é de 0,2 mol L⁻¹ (MALAVOLTA et al., 1989). Neste mesmo extrato ainda podem ser determinados potássio e sódio por emissão; cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre, zinco e alumínio, por absorção atômica. A Figura 1, adaptada de NEIVERTH et al. (1993), apresenta o efeito de diferentes concentrações de HCl na expressão dos resultados analíticos para o fósforo em dois morfotipos de erva-mate. Nota-se também que os dois morfotipos reagem de forma distinta à concentração do ácido solubilizador fornecendo resultados significativamente diferentes.

Observa-se que a medida que a concentração do ácido aumenta até 6 mol L⁻¹ (PERKIN e ELMER, 1973b), diminui o valor da leitura da concentração do fósforo. Isto se deve a interferências, provavelmente pela formação de complexos coloridos de ferro com cloro (SCHLICHTING e BLUME, 1966). Estas questões não representam necessariamente erros analíticos em sua essência, mas sim, limitações metodológicas que devem ser ajustadas para cada elemento. No caso da Figura 1, pode-se supor da influência de um fator matricial até o presente não identificado, permanecendo a possibilidade aventada por SCHLICHTING e BLUME (1966). Qual seja, dependeria de investigações pertinentes. Portanto, na execução de uma pesquisa, a referência adequada do método é fundamental. A princípio, pode-se dizer, com base na diversidade de materiais objetos da análise, que nenhuma metodologia foi plenamente exaurida em suas possibilidades quanto a sua otimização. Em função dessa variabilidade de matrizes e condições laboratoriais, aliada a diferentes graus de ajuste das curvas de calibração, surgiram os diferentes processos analíticos.

As recomendações da concentração de ácidos para a solubilização das cinzas variam. JONES e CASE (1990) sugerem que a concentração final da solução atinja até 1 mol L⁻¹ no caso da água régia ou uma dissolução das cinzas em solução ácida contendo 3% de HCl e 1% de HNO₃ v/v.

MUNTER e GRANDE², citados por JONES e CASE (1990) sugerem uma dissolução das cinzas em HCl a 2 mol L⁻¹ em chapa de aquecimento até a evaporação total com ressolubilização em água deionizada, o que levaria a concentração ácida a níveis baixíssimos na solução final. No entanto, reporta-se que os autores encontraram resultados excelentes quando comparados com amostras de referência

²MUNTER, R.C.; GRANDE, R.A. Plant tissue and soil extract analysis by ICP-atomic emission spectrometry. In: R.M. BARNES (Ed.) Developments in atomic plasma spectrochemical analysis. London: Heyden and Sons, 1981. p. 653-672.

padrão. Soluções mais diluídas são também referenciadas por PREGNOLATO e PREGNOLATO (1985) empregando o HCl a 10% v/v para a solubilização das cinzas, conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz.

No caso do laboratório de Nutrição de Plantas e Biogeoquímica da UFPR, tem sido usual a dissolução das cinzas em HCl 3 mol L⁻¹ (PERKIN e ELMER, 1973a) para uma diluição final de 1:10 v/v em água deionizada, finalizando numa concentração aproximada de 0,3 mol L⁻¹ na

solução de análise.

Esta recomendação aproxima-se bastante do procedimento de HILDEBRAND et al., (1976) que sugerem a dissolução das cinzas em HCl diluído a 10% com posterior diluição 1:10.

Em trabalho envolvendo o comportamento do milho sob calagem com calcário comercial e da formação Irati, o método relacionou com alta significância os teores do solo com os teores de manganês nas folhas conforme pode ser constatado na Figura 2 (ASSMANN et al., 1999).

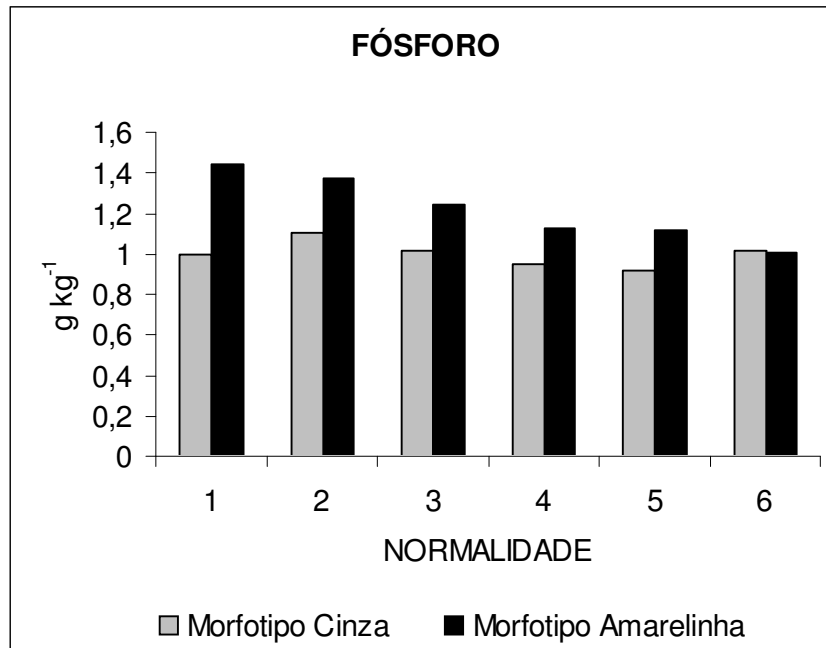


FIGURA 1 – Efeito da concentração do ácido clorídrico na leitura de fósforo em matrizes de erva-mate. Adaptado de NEIVERTH et al. (2003).

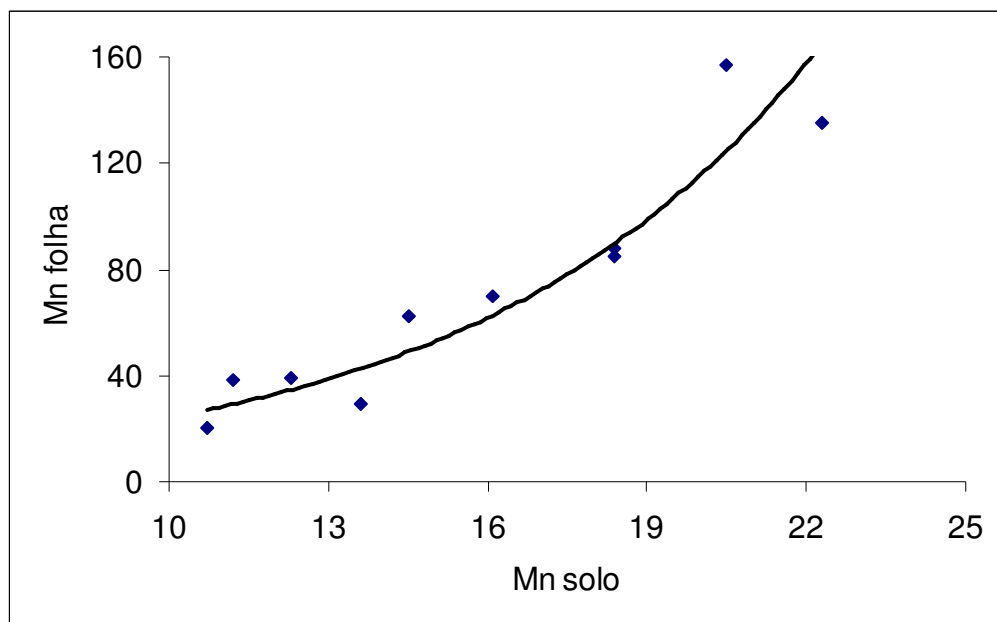


FIGURA 2 – Teores de manganês no solo extraído com DTPA-TEA (mg kg⁻¹ M. S.) e no tecido das folhas da planta de milho obtido com HCl diluído a 10% (mg kg⁻¹ M. S.), modificado de ASSMANN et al. (1999).

Embora não atingindo o mesmo nível de solubilização da digestão via úmida para alguns elementos, em um estudo com erva-mate, o método HCl 3 mol L⁻¹ proporcionou excelentes resultados, sendo possível discernir com segurança diferenças significativas do efeito residual da calagem (CARNEIRO, 2001). Neste mesmo trabalho ficou demonstrado que concentrações bem mais diluídas do ácido (Tabela 1) podem proporcionar leituras mais

elevadas do que a nitro-perclórica ou a digestão via seca dependendo do elemento.

A vantagem de usar uma concentração intermediária de 3 mol L⁻¹ é que causa dissolução satisfatória da cinza, não havendo forte efervescência, como no caso do uso de 6 mol L⁻¹, podendo levar à perdas de particulados da cinza e assegura um tempo de armazenamento maior que altas diluições.

TABELA 1 – Proporcionalidade de extração em função da metodologia utilizada.

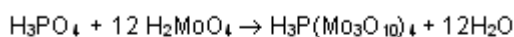
Elementos	Método (%)		
	Digestão Nitro-perclórica	Digestão Cadinho Porcelana	Não Digestão HCl 0,33 mol L ⁻¹
Ca	100,00	64,45	75,11
K	100,00	86,31	97,11
Mg	87,18	93,62	100,00
Al	100,00	90,34	88,45

Fonte: (Adaptado de CARNEIRO, 2001).

É importante frisar que o método escolhido deve proporcionar segurança e confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, as condições do laboratório devem permitir o uso seguro para o operador com base nas instalações adequadas que cada método requer. Somam-se a isto, os aspectos ambientais, como por exemplo, disposição de resíduos sólidos, líquidos e gasosos (ZAGATO et al., 1981).

FÓSFORO

A execução da análise do P em tecidos de plantas se fundamenta na metodologia adaptada de MALAVOLTA et al. (1989) e SILVA (1999), correspondendo a determinação com molibdato-vanadato de amônio de reação amarela.



(Equação 18)

Na presença de agentes redutores, o molibdênio é reduzido de Mo⁺⁶ para Mo⁺⁵ ou Mo⁺³, resultando em uma coloração azul. Normalmente o método amarelo é usado em tecidos de plantas onde as concentrações de fósforo são mais elevadas, sendo lido na faixa de 420 nm.

Para o procedimento do método amarelo, é exemplificado inicialmente o preparo dos reagentes, seguindo-se o preparo correspondente da curva de calibração e, finalmente, o cálculo da concentração do elemento em uma amostra qualquer.

Preparo dos reagentes e soluções

O preparo das soluções e reagentes abaixo seguem uma adaptação de SILVA (1999) e MALAVOLTA et al. (1997).

a) Solução de molibdato 5%: dissolver 25 g de

(NH₄)₆MoO₂₄ P.A., em 400 mL de água quente (sem ferver), esfriar e completar o volume até 500 mL com água deionizada. Deve ser guardado em frasco âmbar.

b) Solução de vanadato 0,25%: dissolver 1,25 g de (NH₄)₂VO₃ P. A., em 500 mL de água quente e adicionar 175 mL de HNO₃ 65%. Deve ser guardado em frasco âmbar.

c) Ácido sulfúrico 5 mol L⁻¹ (10 N): em um balão de 1000 mL adicionar aproximadamente 400 mL de água deionizada e 277,4 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume com água deionizada.

d) Reativo molibdato-vanadato de amônio amarelo: misturar o molibdato de amônio e o vanadato de amônio na proporção 1:1. Esta mistura deve ser efetuada no momento do preparo da curva.

e) Ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (1 N): em um balão de 1000 mL adicionar aproximadamente 400 mL de água deionizada e 27,74 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume com água deionizada.

Marcha analítica

Solução Estoque (S.E.) de fósforo 80 ppm:

Preparar uma solução estoque (S.E.) de fósforo 80 ppm P (= 80 mg P L⁻¹ = 80 mg P mL⁻¹) em balão volumétrico de 1000 mL: Pesar 0,3509 g de KH₂PO₄ (fosfato monobásico de potássio) seco em estufa por 2 horas a 70-80 °C e resfriado em dessecador. Dissolver este sal em balão volumétrico de 1000 mL contendo 300 mL de água deionizada e 10 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹. Agitar para dissolver e completar o volume com água deionizada.

Solução de aferição para a curva

Em balão volumétrico de 100 mL pipetar 0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 mL da solução estoque (80 mg P mL⁻¹) e 4,0 mL de ácido sulfúrico 5 mol L⁻¹ e

completar o volume com água deionizada. Essas soluções contêm respectivamente 0 - 4 - 8 - 12 - 16 - 20 mg P mL⁻¹.

Sendo a solução zero composta apenas de 4 mL de ácido sulfúrico 5 mol L⁻¹ e água deionizada, conforme a Tabela 2.

TABELA 2 – Composição da curva de aferição.

Solução estoque (mL)	Ácido sulfúrico 5 mol L ⁻¹ (mL)	Água deionizada (balão de 100 mL)	Concentração (µg mL ⁻¹)
0,0	4	90	0
5,0	4	85	4
10,0	4	80	8
15,0	4	75	12
20,0	4	70	16
25,0	4	65	20

Isto porque, por exemplo:

$$5 \text{ mL S.E.} \times 80 \text{ mg P mL}^{-1} = 400 \text{ mg P } 100 \text{ mL}^{-1} = [4 \text{ mg P mL}^{-1}] \quad (\text{Equação 19})$$

$$10 \text{ mL S.E.} \times 80 \text{ mg P mL}^{-1} = 800 \text{ mg P } 100 \text{ mL}^{-1} = [8 \text{ mg P mL}^{-1}] \quad (\text{Equação 20})$$

$$15 \text{ mL S.E.} \times 80 \text{ mg P mL}^{-1} = 1200 \text{ mg P } 100 \text{ mL}^{-1} = [12 \text{ mg P mL}^{-1}] \quad (\text{Equação 21})$$

$$20 \text{ mL S.E.} \times 80 \text{ mg P mL}^{-1} = 1600 \text{ mg P } 100 \text{ mL}^{-1} = [16 \text{ mg P mL}^{-1}] \quad (\text{Equação 22})$$

$$25 \text{ mL S.E.} \times 80 \text{ mg P mL}^{-1} = 2000 \text{ mg P } 100 \text{ mL}^{-1} = [20 \text{ mg P mL}^{-1}] \quad (\text{Equação 23})$$

Preparo da Curva Padrão

Em frascos de no mínimo 15 mL pipetar 5 mL da solução de aferição (Tabela 1), adicionar 2 mL do reativo de molibdato-vanadato de amônio (amarelo 1:1). Deixar em repouso por

10 minutos e ler no espectrofotômetro UV-VIS I = 420 nm em até duas horas, que é o máximo da estabilidade da cor. Essas soluções contêm respectivamente 0- 20 - 40 - 60 - 80 - 100 mg P, conforme a Tabela 3.

TABELA 3 – Demonstrativo da composição da curva de calibração.

Solução de aferição (mL)	reativo (mL)	Concentração (µg 5 mL ⁻¹)
5	2	0
5	2	20
5	2	40
5	2	60
5	2	80
5	2	100

Preparo das soluções das amostras para leitura
Na sequência, as amostras são preparadas conforme abaixo:

1 mL da amostra + 4 mL de água deionizada + 2 mL do reativo molibdato vanadato de amônio. Caso a leitura da amostra ultrapasse os limites da curva é preciso diluí-la antes da mistura com o reativo³.

Modelo de cálculo resumido

Em alguns casos, o volume da amostra pode ser 25 ou 50 mL de acordo com a quantidade de

matéria seca (M.S.) utilizada, que deve ser levado em conta no cálculo. Da mesma forma a matéria também pode variar de 0,200 até 1,0 g. Quanto menos biomassa for digerida, menor o volume do balão volumétrico: 1 g M.S., balão de 100 mL; 0,5 g M.S., balão de 50 mL, e assim por diante. Estes procedimentos foram adaptados de MALAVOLTA et al. (1997).

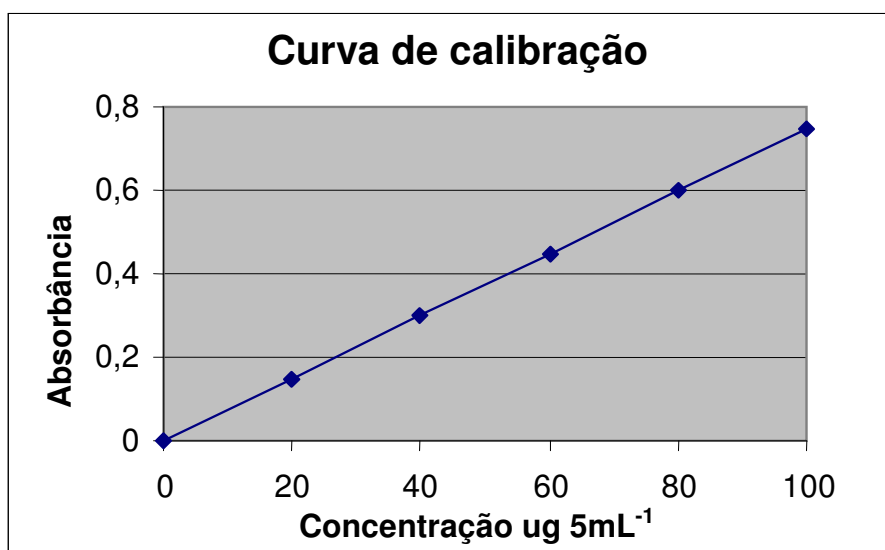
Assumindo uma curva de 0 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 mg 5 mL⁻¹, conforme a Tabela 4.

³Nota: Não se pode diluir a amostra depois de reagida. Exemplo: 0,5 mL da amostra + 4,5 mL de água deionizada + 2 mL do reativo ou 0,1 mL da amostra + 4,9 mL de água deionizada + 2 mL do reativo

TABELA 4 – Curva de calibração do fósforo - $\lambda = 420$ nm.

[P] $\mu\text{g } 5\text{mL}^{-1}$	Absorbância
0,0	0,0
20,0	0,150
40,0	0,297
60,0	0,450
80,0	0,608
100,0	0,750

A Figura 3 mostra a curva de calibração típica para a determinação do fósforo.

FIGURA 3 – Curva de calibração do fósforo - $\lambda = 420$ nm.

Considerando um resultado de leitura de $14,179 \mu\text{g P}$ correspondendo a um valor de $0,1098$ u. a. calculamos que em um balão volumétrico de 100 ml temos dissolvido $1,0070$ g de M. S. da amostra. Portanto:

Se em 100 mL de solução — $1,0070$ g M. S.

1 mL de solução ————— x (g)

$$x = \frac{1 \text{ mL} \times 1,0070 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

$$x = 0,01007 \text{ g M.S.}$$

Se em $0,01007$ g M.S. ----- $14,179 \mu\text{g P}$

1000 g M. S. ----- x (g)

(Equação 24)

$$x = \frac{1000 \text{ g} \times 14,179 \mu\text{g}}{0,01007 \text{ g} \times \text{g}}$$

$$x = 1408043,694 \mu\text{g P g}^{-1}$$

$$x = 1,41 \text{ g P kg}^{-1} \text{ M.S.}$$

(Equação 25)

Para evitar o andamento acima se pode usar a fórmula resumida abaixo:

$$(\text{g P kg}^{-1} \text{ M.S.}) : \frac{C \text{ lida}}{\text{peso da amostra} \times 10}$$

(Equação 26)

$$\text{Substituindo} = \frac{14,179}{1,0070 \times 10}$$

$$1,41 \text{ g P kg}^{-1} \text{ M.S.}$$

Cálculo com exemplo concreto considerando apenas uma solução qualquer.

Considerando para fins de exemplificação, o mesmo resultado de 14,179 mg P, correspondendo a um valor de 0,1098 unidades de absorção, conforme o exemplo anterior. Simulando que esse valor foi encontrado em uma solução aquosa (água, extrato de planta ou extrato do solo), assumimos que esse 1 mL da solução corresponde a este mesmo teor de P. Como a solução está contida em balão volumétrico de 100 mL, basta multiplicar esse valor por 100.

$$1 \text{ mL} \text{ ----- } 14,179 \text{ } \mu\text{g P}$$

$$100 \text{ mL} \text{ ----- } x$$

$$x = \frac{100 \text{ mL} \times 14,179 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ mL}}$$

$$x = 1417,9 \text{ } \mu\text{g P}$$

(Equação 27)

Como expressamos os valores de concentração em mg L⁻¹ vem:

$$100 \text{ mL} \text{ ----- } 1417,9 \text{ } \mu\text{g P}$$

$$1000 \text{ mL} \text{ ----- } x$$

$$x = \frac{1000 \text{ mL} \times 1417,9 \text{ } \mu\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

$$x = 14179 \text{ } \mu\text{g P}$$

(Equação 28)

Transformando para miligrama vem:

$$14179 \div 1000 = 14,179 \text{ mg P } \times \text{L}^{-1}$$

(Equação 29)

Outro caminho seria:

$$\frac{14,179 \text{ } \mu\text{g P} \times \text{mg} \times 1000 \text{ mL}}{1 \text{ mL} \times 10^{-3} \text{ g} \times 1 \text{ L}}$$

$$\frac{14,179 \times 10^{-6} \text{ P} \times \text{mg} \times 10^3}{10^{-3} \text{ L}}$$

$$\frac{14,179 \times 10^{-6} \text{ P} \times \text{mg} \times 10^3 \times 10^3}{\text{L}}$$

$$\frac{14,179 \text{ mg P}}{\text{L}}$$

$$14,179 \text{ mg P L}^{-1}$$

(Equação 30)

POTÁSSIO

O princípio da determinação do potássio requer o fotômetro de chama porque este equipamento quantifica os fótons emitidos pelos átomos de potássio, excitados pelo calor de uma chama de GLP (gás liquefeito de petróleo), podendo atingir uma temperatura de 700 °C (TOMÉ,1997).

Marcha analítica

Preparo da solução estoque de potássio:
Dissolver 0,9534 g de KCl em 500 mL de água deionizada, *resultando em 1000 mg K L⁻¹.*

Solução padrão

$$0,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 \text{ e } 40,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$$

Preparo da curva: Pipetar em balão volumétrico de 100 mL 0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 4,0 mL da solução estoque e completar com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (4,25 mL HCl_{conc.} em balão volumétrico de 500 mL).

Preparo das soluções das amostras para leitura: 1 mL da amostra + 9 mL água deionizada.

Exemplo de curva de calibração

A Tabela 5 resume a composição da curva de calibração para o potássio:

TABELA 5 – Curva de calibração para o potássio.

mg L ⁻¹	mg mL ⁻¹	µg mL ⁻¹	Emissão
0	0,000	0	0,0
5	0,005	5	5
10	0,010	10	12
20	0,020	20	22
40	0,040	40	40

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de 12,0 mg K mL⁻¹ com fator de diluição (F.D.) 1:10, a partir de um volume inicial de 100 ml onde foi dissolvido 1,0 g de M. S. da amostra, calcula-se:

$$[K] = \frac{\text{leitura} \times \text{F.D.} \times \text{volume do balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[K] = \frac{12 \mu\text{g mL}^{-1} \times 10 \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

(Equação 31)

Transformando os dados na unidade final requerida, g kg⁻¹, vem:

$$\frac{12000 \mu\text{g}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}}$$

$$\frac{12 \times 10^3 \text{ g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ g}}{\text{g kg}}$$

$$[K] = 12000 \mu\text{g g}^{-1}$$

$$[K] = 12 \text{ g kg}^{-1}$$

(Equação 32)

SÓDIO

O princípio para determinação do sódio, por se tratar de fotometria de emissão é o mesmo conforme citado acima para o potássio.

Marcha analítica

Preparo da solução estoque de sódio: Dissolver 1,27105 g de NaCl em 500 mL de água deionizada, resultando em 1000 mg Na L⁻¹ (mg L⁻¹ = µg mL⁻¹).

Solução padrão

0,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 e 40,0 µg mL⁻¹

Preparo da curva: Pipetar para balão volumétrico de 100 mL 0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 4,0 mL da solução estoque e completar com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (4,25 mL HCl_{conc.} em balão volumétrico de 500 mL).

Preparo das soluções das amostras para leitura: A leitura é feita diretamente no frasco da amostra, geralmente dispensando diluição.

Exemplo de curva de calibração: A Tabela 6 resume a composição da curva de calibração para o sódio:

TABELA 6 – Curva de calibração para o sódio.

mg L ⁻¹	mg mL ⁻¹	µg mL ⁻¹	Emissão
0	0,000	0	0
5	0,005	5	5
10	0,010	10	11
20	0,020	20	20
40	0,040	40	40

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Na, onde a leitura foi feita diretamente na solução de digestão contendo 1,00 g M.S. em 100 mL de solução.

$$[\text{Na}] = \frac{\text{leitura} \times \text{volume do balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[\text{Na}] = \frac{10 \mu\text{g mL}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

$$[\text{Na}] = 1000 \mu\text{g g}^{-1}$$

(Equação 33)

Transformando os dados na unidade final requerida, g kg^{-1} , vem:

$$\frac{1000 \mu\text{g}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}}$$

$$\frac{1 \times 10^3 \text{ g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ g}}{\text{g kg}}$$

$$1 \text{ g kg}^{-1}$$

(Equação 34)

CÁLCIO, MAGNÉSIO, FERRO E MANGANÊS

O princípio da determinação dos elementos químicos via espectroscopia de absorção atômica com chama, se baseia no fato da solução da amostra ser aspirada para o interior de uma chama após haver sido nebulizada na câmara de mistura. Nesta fase os compostos inorgânicos são termicamente dissociados em um vapor atômico. O termo absorção atômica se refere à absorção de energia de uma fonte luminosa, geralmente uma lâmpada de cátodo oco, com o conseqüente decréscimo do poder radiante transmitido através da chama (CHRISTIAN, 1978). Por esse processo são determinados: cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco e cobre. Geralmente, a chama é gerada através de uma mistura ar-acetileno. O cálcio e magnésio sofrem interferência do fósforo, para eliminá-la são usados aditivos como nitrato de lantânio, óxido de lantânio, cloreto de lantânio e cloreto de estrôncio, normalmente em concentrações de aproximadamente 1%, dependendo do nível de fosfato na solução (CHRISTIAN, 1978; WELZ, 1972).

Marcha analítica

As curvas para determinação destes elementos são preparadas a partir de uma solução estoque que contém quantidades definidas para cada elemento por litro. As soluções estoque são preparadas a partir de padrões comerciais P.A., contendo 1000 mg do elemento em ampolas lacradas, conforme a Tabela 7.

TABELA 7 – Composição da solução padrão de Ca, Mg, Fe e Mn.

Elemento	Concentração
Ca	$0,5 \text{ g L}^{-1}$
Mg	$0,1 \text{ g L}^{-1}$
Fe	$1,0 \text{ g L}^{-1}$
Mn	$1,0 \text{ g L}^{-1}$

Curva de calibração de cálcio e magnésio: Para obtenção da solução padrão de Ca e Mg, pipetar para balão volumétrico de 50 mL, 0,0 - 0,05 - 0,15 - 0,3 e 0,4 mL da solução estoque, acrescentar 5 mL SrCl_2 (1,5% em HCl 17%), adicionar 10 mL ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (4,25 mL $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ em balão volumétrico de 500 mL) e completar o volume com água deionizada (HILDEBRAND et al., 1976).

Solução padrão de cálcio

$$0,0 - 0,5 - 1,5 - 3,0 \text{ e } 4,0 \mu\text{g Ca mL}^{-1}$$

Solução padrão de magnésio

$$0,0 - 0,1 - 0,3 - 0,6 \text{ e } 0,8 \mu\text{g Mg mL}^{-1}$$

A calibração da curva é feita inicialmente no modo absorção onde é verificada a linearidade da curva. Para a leitura das amostras é preciso passar para o modo concentração, sendo um recurso do equipamento que permite obter as leituras diretamente em mL^{-1} ou mg L^{-1} . Os procedimentos operacionais dependerão da marca do equipamento. O limite das curvas também é ditado pelas especificações do equipamento. Antes de iniciar a leitura, o equipamento é zerado com a solução “zero”, ou branco que contém apenas os reagentes sem o elemento de interesse. Isto é válido para todos os elementos. No preparo das curvas é preciso atentar para a sua durabilidade, assim como, as soluções estoque. De acordo com ZAGATO et al. (1981), soluções cuja concentração exceda a 100 mg L^{-1} podem ser armazenadas até dois meses. Já, as soluções para a calibração, que são bastante diluídas não devem ser armazenadas por mais de uma semana.

Preparo das soluções das amostras para leitura: 0,05 mL amostra + 0,5 mL SrCl_2 + 4,45 mL água deionizada.

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ Ca, com fator de diluição F.D. 1:10, a partir de um volume inicial de 100 mL onde foi dissolvido 1,0 g de M. S. da amostra, calcule-se:

$$[\text{Ca}] = \frac{\text{leitura} \times \text{F.D.} \times \text{volume balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[\text{Ca}] = \frac{0,45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1} \times 10 \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

$$[\text{Ca}] = 450 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$$

(Equação 35)

Transformando os dados na unidade final requerida, g kg^{-1} , vem:

$$\frac{450 \text{ } \mu\text{g}}{\text{g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}}$$

$$\frac{450 \text{ } \mu\text{g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ g}}{\text{g} \times \text{kg}} = \frac{450 \times 10^{-2} \text{ g}}{\text{kg}}$$

$$[\text{Ca}] = 0,45 \text{ g kg}^{-1}$$

(Equação 36)

O magnésio é calculado da mesma forma.

Curva de calibração de ferro e manganês: Para o preparo da curva de calibração de ferro e manganês é utilizada a mesma solução estoque de cálcio e magnésio, excetuando-se a adição de cloreto de estrôncio.

Pipetar em balão volumétrico de 50 mL 0,0 - 0,05 - 0,15 - 0,3 e 0,4 mL da solução estoque, adicionar 10 mL ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (4,25 mL $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ em balão volumétrico de 500 mL) e completar o volume com água deionizada. Este procedimento permite a obtenção das soluções para calibração do Fe e do Mn, conforme abaixo especificado.

Solução padrão de ferro:

$$0,0 - 0,5 - 1,5 - 2,0 - 3,0 \text{ e } 5,0 \text{ } \mu\text{g Fe mL}^{-1}$$

Solução padrão de manganês:

$$0,0 - 0,5 - 1,5 \text{ e } 2,0 \text{ } \mu\text{g Mn mL}^{-1}$$

Preparo das soluções das amostras para leitura: A leitura é feita diretamente no frasco da amostra, geralmente dispensando diluição. A leitura do Fe requer checagem constante da curva, tendo em vista sua característica de resultados com alto grau de instabilidade na leitura.

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de $2,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de Fe, onde a leitura foi feita diretamente na solução de digestão contendo 1,00 g M.S. em 100 mL.

$$[\text{Fe}] = \frac{\text{leitura} \times \text{volume do balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[\text{Fe}] = \frac{2,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

$$[\text{Fe}] = 210 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$$

(Equação 37)

Transformando os dados na unidade final requerida, mg kg^{-1} vem:

$$\frac{210 \text{ } \mu\text{g}}{\text{g}} \times \frac{10^3 \text{ mg}}{1 \text{ kg}}$$

$$\frac{210 \text{ g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ mg}}{\text{g} \times 10^{-3} \text{ kg}}$$

$$[\text{Fe}] = 210 \text{ mg kg}^{-1}$$

(Equação 38)

Para os cálculos do manganês, proceder da mesma maneira.

COBRE

Marcha analítica

Solução padrão de cobre: Pipetar para balão volumétrico de 100 mL 0,0 - 0,01 - 0,03 e 0,06 mL da solução estoque, que contém 1 g L^{-1} de Cu, adicionar

10 mL ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (4,25 mL HCl_{conc.} em balão volumétrico de 500 mL) e completar o volume com água deionizada. Com este procedimento obtém-se a solução para calibração conforme abaixo especificado.

$$0,0 - 0,1 - 0,3 - 0,6 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$$

Preparo das soluções das amostras para leitura: A leitura é feita diretamente no frasco da amostra, dispensando diluição.

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de 0,130 mg mL⁻¹ de Cu, onde a leitura foi feita diretamente na solução de digestão contendo 1,00 g M.S. em 100 mL.

$$[\text{Cu}] = \frac{\text{leitura} \times \text{volume do balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[\text{Cu}] = \frac{0,130 \mu\text{g mL}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

$$[\text{Cu}] = 13 \mu\text{g g}^{-1}$$

(Equação 39)

Transformando os dados na unidade final requerida, mg kg⁻¹, tem-se:

$$\frac{13 \mu\text{g}}{\text{g}} \frac{10^3 \text{ mg}}{10^{-3} \text{ kg}}$$

~~$$\frac{13 \text{ g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ mg}}{\text{g} \times 10^{-3} \text{ kg}}$$~~

$$[\text{Cu}] = 13 \text{ mg kg}^{-1}$$

(Equação 40)

ZINCO

Marcha analítica

Solução padrão de zinco: Pipetar em balão volumétrico de 100 mL 0,0 - 0,01 - 0,03 e 0,05 mL da solução estoque, que contém 1 g L⁻¹ de Zn, adicionar 10 mL ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (4,25 mL HCl_{conc.} em balão volumétrico de 500 mL) e completar o volume com água deionizada. Com este procedimento obtém-se a solução para calibração conforme abaixo especificado.

$$0,0 - 0,1 - 0,3 - 0,5 \mu\text{g Zn mL}^{-1}$$

Preparo das soluções das amostras para leitura: A leitura é feita diretamente no frasco da amostra, dispensando diluição.

Exemplo de cálculo: Considerando um resultado de 0,300 mg mL⁻¹ de Zn, onde a leitura foi feita diretamente na solução de digestão contendo 1,00 g M.S. em 100 mL.

$$[\text{Zn}] = \frac{\text{leitura} \times \text{volume do balão}}{\text{peso (g)}}$$

$$[\text{Zn}] = \frac{0,300 \mu\text{g mL}^{-1} \times 100 \text{ mL}}{1,00 \text{ g}}$$

$$[\text{Zn}] = 30 \mu\text{g g}^{-1}$$

(Equação 41)

dados na unidade final requerida, mg kg⁻¹, tem-se:

$$\frac{30 \mu\text{g}}{\text{g}} \frac{10^3 \text{ mg}}{10^{-3} \text{ kg}}$$

~~$$\frac{13 \text{ g} \times 10^{-6} \times 10^3 \text{ mg}}{\text{g} \times 10^{-3} \text{ kg}}$$~~

$$[\text{Zn}] = 30 \text{ mg kg}^{-1}$$

(Equação 42)

OUTRAS METODOLOGIAS UTILIZADAS

NITROGÊNIO VIA SECA – DUMAS

Nesse procedimento o nitrogênio orgânico total é convertido a nitrogênio molecular (JONES e CASE, 1990). Para este procedimento é recomendado que o material seja muito finamente moído, tendo em vista a pequena quantidade a ser usada, geralmente menos que 100 mg de material vegetal. Este método correlaciona-se bem com o método tradicional Kjeldahl, porém apresenta teores levemente mais altos 1-4 %, que segundo SAINT-DENIS e GOUPY (2004) continua sendo um método de referência. Apesar de dispendioso em termos de tempo.

Especialmente na indústria de alimentos e nutrição animal, o método Kjeldahl vem sendo substituído pelo método de combustão Dumas. Isto também se deve ao fato do grande volume de resíduos, agressivos ao meio ambiente, gerados pelo processo Kjeldahl (SADER et al., 2004). LIANG et al. (1999) também optaram pelo emprego dessa metodologia, enaltecendo o uso de menores quantidades de reagentes agressivos.

O método em questão não será descrito no presente texto, sendo recomendado reportar-se à leitura especializada e aos manuais específicos do equipamento.

EXTRAÇÃO VIA ÚMIDA EM HCl 0,33 mol L⁻¹

Este é um procedimento bastante simples de obtenção de extratos analíticos e foi adaptado de MIYASAWA et al. (1984) oferecendo ótimos resultados de calibração com processos mais agressivos de digestão (CARNEIRO, 2001).

Pesa-se de 0,5000 a 1,0000 g de material

vegetal da amostra, seco em estufa a 60-65 °C, em balões volumétricos específicos para esse fim ou em erlenmeyer de 50 mL. Em seguida, adiciona-se 25 mL de HCl 0,33 mol L⁻¹ a cada tubo pesando-se o conjunto. Os balões ou tubos com as amostras são aquecidos por 15 minutos à temperatura de 80 °C. Após o resfriamento, à temperatura ambiente, o peso é reajustado ao peso inicial com água deionizada, devido à possíveis evaporações de HCl.

As amostras são submetidas a um agitador horizontal por 50 minutos, filtradas em papel filtro (Framex quantitativo 389³ de 15 cm de diâmetro, liberação lenta) e acondicionadas em frascos apropriados, estando em condições de leitura.

No caso de se utilizarem balões volumétricos neste processo, os mesmos não podem ser usados para aferição de volume devendo ser utilizados somente para este fim.

DIGESTÃO POR RADIAÇÃO MICROONDAS

A amostra da planta é solubilizada em uma solução de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, em sistema fechado sob alta temperatura e pressão. Existe outro processo para um volume maior de amostra, operado em temperatura mais baixa e em sistema aberto sob pressão ambiente. Para detalhes, consultar NOGUEIRA e SOUZA (2005), além da literatura especializada pertinente ao equipamento específico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos revisores científicos pelas valiosas contribuições, que permitiram o aperfeiçoamento do texto.

REFERÊNCIAS

1. ASSMANN, T.S.; PREVEDELLO, B.M.S.; REISSMANN, C.B.; RIBEIRO JR., P.J. Potencial de suprimento de micronutrientes de calcário oriundo da mineração de folhelho pirotbetuminoso da formação Irati-Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23., p. 963-969, 1999
2. BATAGLIA, O.C.; SANTOS, W.R. Estado nutricional de plantas perenes: Avaliação e monitoramento. **Informações Agronômicas**, n. 96, p. 1-8, 2001.
3. BREMNER, J.M. Nitrogen-Total. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**: Part 3 Chemical Methods. Madison: SSSA, 1996. p. 1085-1121. (SSSA Book Series, 05).
4. CARNEIRO, C. **Comparação de cinco métodos de análise química foliar utilizando a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) como matriz analítica**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias.
5. CHRISTIAN, G.D. Flame Spectroscopy. In: BAUER, H.H.; CHRISTIAN, G.D.; O'REILLY, J.E. (Eds.). **Instrumental Analysis**. Boston: Allyn and Bacon, 1978. 832 p.
6. HERMANN, A.G. *Praktikum der gesteinsanalyse*. Berlin: Springer-Verlag, 1975. 204p.
7. HILDEBRAND, C.; HILDEBRAND, E.E.; REISSMANN, C.B. **Manual de análise química do solo e foliar para técnicos de laboratório**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 1976. 214p.
8. JONES JR., J.B. **Plant Nutrition Manual**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 149 p.
9. JONES JR., J.B.; CASE, V.W. Sampling handling and analyzing plant tissue samples. In: WESTERMAN R. L. (Ed.). **Soil testing and plant analysis**. Madison: SSSA, 1990. p. 389-427. (SSSA Book Series, 03).
10. JONES JR., J.B.; ECK, H.V.; VOSS, R. Plant analysis as an aid in fertilizing corn and grain sorghum. In: WESTERMAN R.L. (Ed.). **Soil testing and plant analysis**. Madison: SSSA, 1990. p. 521-547. (SSSA Book Series, 03).
11. KENKEL, J. **Analytical chemistry for technicians**. Boca Raton: CRC. 1994. 541 p.
12. KUO, S. Phosphorus. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1996. p. 869-919. (SSSA Book Series, 05).
13. LIANG, B.C.; MACKENZIE, A.F.; GREGORICH, E.G. Measurement of fixed ammonium and nitrogen isotope ratios using dry combustion. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, p. 1667-1669, 1999.

14. MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; DE OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: Princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1989. 201 p.
15. MIYASAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCK M.F.M. Determinations of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 15, n. 2, p. 141-147, 1984.
16. NEIVERTH, P.C.; MACCARI JR, A.; REISSMANN, C.B.; RIBEIRO, M.M. Digestão via seca de dois morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) submetidos a diferentes normalidades de HCl na solubilização das cinzas. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., FEIRA DO AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 1. **Resumos**. Chapecó, 2003. p. 47.
17. NOGUEIRA, A.R. de A.; SOUZA, B. G. de. **Manual de laboratório**: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: EMBRAPA, 2005. 334 p.
18. OFFICE OF ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY. **Chemical safety manual**. San Francisco: University of California, 2001. 120 p. Disponível em <<http://www.ehs.ucsf.edu/Manuals/CSM/oehsCSMFull.asp>> acesso em 12/06/2006.
19. PAGEL, H.; ENZMANN, I.; MUTSCHER, H. **Pflanzennährstoffe in tropischem böden - ihre bestimmung und bewertung**. Berlin: Deutscher Landwirtschaftsverlag, 1982. 272 p.
20. PERKIN & ELMER **Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Analytical methods - Agriculture**. Section AY - 11. Analysis of Feeds. Norwalk: Perkin-Elmer Corporation, 1973a.
21. PERKIN & ELMER **Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Analytical methods - Agriculture**. Section AY - 4. Analysis of Plant Tissue - Dry Ashing Procedure. Norwalk: Perkin & Elmer Corporation, 1973b.
22. PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. v. 1. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985 147 p.
23. SADER, A.P.O.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T. Application of Kjeldahl and Dumas combustion methods for nitrogen analysis. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 73-79, 2004.
24. SAINT-DENIS, T.; GOUPY, J. Optimization of a nitrogen analyzer based on the Dumas method. **Analytica Chimica Acta**, v. 515, p. 191-198, 2004.
25. SCHLICHTING, E.; BLUME, H-P. **Bodenkundliches praktikum**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1966. 209 p.
26. SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos: 1999. 370 p.
27. STEUBING, L **Pflanzenökologisches praktikum**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1965. 262 p.
28. STEYN, W.J.A. Leaf analyses. Errors involved in the preparation phase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, p. 344-348, 1959.
29. TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p. (Boletim Técnico de Solos, 05.)
30. TOMÉ JR., J.B. **Manual para interpretação de análise de solo**. Guaíba: Agropecuária, 1997. 247 p.
31. WELZ, B. **Atom-absorptions-spektroskopie**. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1972. 216 p.
32. WEETMAN, G.F.; WELLS, C.G. Sampling handling and analyzing plant tissue samples. In: WESTERMAN et al. (Eds.) **Soil testing and plant analysis**. Madison: SSSA, 1990. p. 659-685. (SSSA Book Series, 03).
33. ZAGATTO, E.A.G.; JACINTO, A.O.; REIS, B.F. et al. **Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção de fluxo**. Piracicaba: USP/CENA, 1981. 45 p.

Recebido em 04/10/2006

Aceito em 03/04/2007