

631.417202

N778m

2006.04115

Manual de Laboratórios:
Solo, Água, Nutrição Vegetal,
Nutrição Animal e Alimentos



ÁREA DE INFORMAÇÃO
CPPSE

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luiz Carlos Guedes Pinto

Presidente

Alexandre Kalil Pires

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Pecuária Sudeste

Nelson José Novaes

Chefe-Geral

Airton Manzano

Chefe-Adjunto de Administração

Alfredo Ribeiro de Freitas

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sérgio Novita Esteves

Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos

Editores:

Ana Rita de Araujo Nogueira

Gilberto Batista de Souza

*São Carlos, SP
2005*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3361-5611
Fax: (16) 3361-5754
Home page: www.cppse.embrapa.br
E-mail: sac@cppse.embrapa.br

Revisor de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Arte Gráfica (capa): Gerson Luiz Carbonero

Tiragem: 1000 exemplares

EMBRAPA Pecuária Sudeste
Valor Aquisição: 0,00
Data Aquisição: 09/11/2006
Nº N. Fiscal Data: _____
Fornecedor: _____
N. Ordem Compra: _____
Origem: _____
N. de Tombo 206.0415

ÁREA DE INFORMAÇÃO - EDITORAÇÃO

Nogueira, Ana Rita de A.

Manual de Laboratório: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos / Ana Rita de Araújo Nogueira, Gilberto Batista de Souza.-- São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

334 p.: il.

ISBN: 85-86764-08-6

Conteúdo: Coleta, Acondicionamento, Preparo de Amostra, Análises Químicas

1. Solo - Água - Nutrição Vegetal - Nutrição Mineral - Nutrição Humana - Nutrição animal - Coleta - Acondicionamento - Amostragem. 2. Solo - Água - Nutrição Vegetal - Nutrição Animal - Metodologias. 3. Laboratório - Manual. I. Nogueira, A.R. de A. (Ed.). II. Batista, G. B. (Ed.).

CDD: 631.417202

©EMBRAPA-2005

CAPÍTULO 8 - TECIDO VEGETAL

Ana Rita A. Nogueira¹

Areolino de Oliveira Matos²

Ciríaca A. F. de Santana do Carmo³, Coordenadora

Daví J. Silva⁴

Flávio Lages Monteiro⁵

Gilberto Batista de Souza

Gilson Villaça Exel Pitta⁶

Gonçalo Mourão Carlos⁷

Henrique de Oliveira⁸

José Aníbal Comastri Filho⁹

Mario Miyazawa¹⁰

Waldemar de Oliveira Neto¹¹

1. INTRODUÇÃO

Os teores dos elementos N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cl, Cu, Fe, Na, Mn, Mo e Zn, encontrados nos tecidos vegetais, constituem um dos parâmetros mais eficientes para avaliar o estado nutricional das plantas. As análises químicas do tecido vegetal, em conjunto com a análise de solo, são amplamente utilizadas na agricultura para diagnóstico do estado nutricional das plantas, constituindo um dos mais valiosos instrumentos de auxílio na recomendação de um programa racional de adubação, principalmente no caso de culturas perenes e semiperenes, como as fruteiras e a cana-de-açúcar. Essas determinações são normalmente realizadas nas folhas, por ser esse o órgão que melhor reflete se a planta está bem nutrida ou não, se há falta ou excesso de nutrientes.

Para a determinação dos teores dos elementos químicos presentes nas plantas, são utilizados diferentes métodos analíticos. Muitos são os fatores envolvidos na escolha dos métodos e os mais importantes são: fatores de segurança (periculosidade, toxidez), disponibilidade do equipamento, elemento a ser determinado, precisão e exatidão, tempo necessário para

¹Embrapa Pecuária Sudeste; ²Embrapa Amazônia Oriental; ³Embrapa Solos; ⁴Embrapa Semi-Árido; ⁵Embrapa Agrobiologia; ⁶Embrapa Milho e Sorgo; ⁷Embrapa Cerrados; ⁸Embrapa Agropecuária Oeste; ⁹Embrapa Pantanal; ¹⁰Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR; ¹¹Embrapa Soja.

obtenção dos resultados, limites de detecção e determinação, capacitação do analista e custo. Os resultados fornecidos são referentes aos teores dos elementos presentes na matéria seca do tecido vegetal.

Neste documento estão descritos alguns dos principais métodos de análise de plantas normalmente executados em laboratórios da Embrapa. São métodos tradicionais, já devidamente avaliados e publicados, que são adotados por apresentarem boas condições de precisão e de exatidão analíticas.

2. DECOMPOSIÇÃO E SOLUBILIZAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

Para a determinação dos teores de elementos químicos individuais em amostras de plantas normalmente é necessária a transformação da matriz orgânica original em uma forma inorgânica simples. A grande maioria das técnicas analíticas exige que o analito esteja dissolvido em meio aquoso. Em razão da baixa solubilidade das plantas em água, para que o analito de interesse esteja disponível para análise é necessária a decomposição do material orgânico com agentes oxidantes e/ou altas temperaturas, para sua incineração e aumento da capacidade oxidante dos ácidos. Apesar de não estarem sendo tratadas neste trabalho, existem técnicas que requerem que as amostras estejam na forma sólida, como espectrometria atômica com arco, fâsca, ablação com laser e aquelas baseadas em reações de combustão. Outras técnicas podem ainda ser aplicadas às amostras, tanto na forma sólida como na forma líquida, tais como análise por ativação neutrônica instrumental e espectrometria de fluorescência de raios X (KRUG, 2000).

Normalmente, a dissolução de plantas é realizada por um dos seguintes métodos: via seca (mediante alta temperatura de combustão) e via úmida (digestão em meio ácido). As duas técnicas apresentam resultados semelhantes, quando realizadas de maneira apropriada. Na escolha de uma técnica ideal para a dissolução de uma amostra, deve-se sempre ter em mente os resultados esperados, tais como os teores aproximados dos

analitos na amostra e os níveis de sensibilidade da técnica que se deseja empregar (AOAC, 1995; MILLS & JONES, 1996; QUEVAULIEE, 1995). Assim, o método deve ser capaz de disponibilizar completamente o elemento de interesse e ser razoavelmente rápido, os reagentes não devem atacar o recipiente em que será feita a reação, o que pode provocar perdas por adsorção e/ou absorção, e não conter contaminantes que possam interferir nos resultados. Deve-se ainda verificar as temperaturas de trabalho, para que não haja perdas por volatilização ou formação de aerossóis e a solução final deverá conter todos os analitos de interesse. Item fundamental a ser considerado é a segurança, pois o procedimento deverá apresentar o mínimo de insalubridade e de periculosidade, devendo-se atentar para o uso correto dos equipamentos de proteção coletiva e individual.

2.2. DECOMPOSIÇÃO POR VIA SECA

2.2.1. PRINCÍPIO

Baseia-se na queima da fração orgânica da amostra, obtendo-se resíduo inorgânico na forma de cinza solúvel em solução diluída de ácido (HCl , HNO_3) ou de álcali (NH_4OH , NaOH). A amostra de tecido vegetal é colocada em cadinho (quartzo, porcelana, etc.) e incinerada em forno tipo mufla elétrico a uma temperatura entre 500 e 550°C na atmosfera ambiente. O oxigênio da atmosfera atua como agente oxidante e o resíduo proveniente da queima é constituído por óxidos de metais, sulfatos não voláteis, fosfatos, silicatos e outros. Por este método podem ser determinados os seguintes elementos: K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, B, Mo e Al.

2.2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Forno do tipo mufla, com controle de temperatura.
- b) Cadinhos de porcelana.
- c) Pinça metálica, para manuseio dos cadinhos.

2.2.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Ácido nítrico (HNO_3), 1,0 mol L⁻¹: diluir 71,4 mL de HNO_3 concentrado em

cerca de 400 mL de água, esfriar e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Completar o volume com água.

c) Ácido clorídrico (HCl), 1,0 mol L⁻¹: diluir 83,3 mL de HCl concentrado em cerca de 400 mL de água, esfriar e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Completar o volume com água.

2.2.5. PROCEDIMENTO

Transferir, para cadinho de porcelana, 0,50 g (\pm 0,001 g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas, com peneira de 1,0 mm. Colocar o cadinho em forno do tipo mufla com temperatura controlada e aumentar gradativamente a temperatura para 500 a 550°C. Incinerar a amostra durante 2 a 4 h, após atingir a temperatura desejada, até a obtenção de cinzas claras. Esfriar, recuperar em 5,0 mL de HCl ou HNO₃ a 1,0 mol L⁻¹. Transferir para balão volumétrico de 25 mL, completar o volume com água e filtrar. A solução está pronta para determinação elementar. O extrato poderá sofrer novas diluições, para obter a concentração do elemento desejado dentro da faixa analítica do instrumento.

OBSERVAÇÕES:

- 1. A temperatura do forno do tipo mufla deve ser elevada lentamente, até atingir de 500 a 550°C. As amostras não devem nunca ser colocadas em forno quente, nem a porta do forno ser aberta durante a fase inicial da queima. Atualmente também são comercializados fornos do tipo mufla que utilizam radiação microondas como fonte de aquecimento.*
- 2. Em certos casos, as perdas por volatilização podem ser evitadas pela adição de modificadores. Por exemplo, adição de H₂SO₄: os cloretos relativamente voláteis, tais como PbCl₂, CdCl₂ e NaCl, são convertidos em sulfatos não voláteis. As perdas de ânions, como os de cloreto e os que contêm arsênio, fósforo ou boro, podem ser evitadas pela adição de várias bases, geralmente óxidos ou hidróxidos de metais alcalinos ou alcalino-terrosos, carbonatos de alcalinos, nitrato de metais alcalino-*

terrosos e acetato de magnésio.

3. Amostras com altos teores de carboidratos requerem o tratamento com agentes modificadores auxiliares para a completa queima do carbono existente na amostra. A presença dos modificadores também pode acelerar a oxidação, prevenir a volatilização de certos componentes das cinzas e prevenir as reações entre os componentes da cinza com o material do cadinho. A seguir, é descrito procedimento que pode ser adotado nesse caso:

Transferir 0,50 g (\pm 0,001 g) de amostra seca e moída para cadinho. Adicionar 10 mL de solução do agente auxiliar (7% (m/v)) de nitrato de magnésio ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) e colocar o cadinho em banho de areia ou sobre chapa aquecedora até completa secagem. Após esse procedimento, o cadinho é colocado no forno do tipo mufla e a temperatura deve ser lentamente elevada até 500°C, permanecendo nessa temperatura durante 4 h. A amostra é resfriada e as cinzas são dissolvidas em HNO_3 ou HCl a 20% (v/v) ou água régia (1 parte de HNO_3 concentrado para 3 partes de HCl concentrado), para solubilização das cinzas.

VANTAGENS

- Não utilização de solução de ácidos oxidantes concentrados.
- Possível utilização de massas elevadas de amostras, o que permite a determinação de elementos presentes em baixas concentrações.

LIMITAÇÕES

- Perdas por volatilização de alguns elementos (Co, Pb, Se, As, dentre outros).
- Baixa velocidade analítica.
- Alto consumo de energia elétrica
- O esmalte de cadinhos de porcelana, mais comumente utilizados, pode reagir com silicatos, fosfatos e óxidos presentes nas amostras. Em casos especiais é recomendável trabalhar com cadinhos de quartzo ou de platina.

2.3. DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA

2.3.1. PRINCÍPIO

É o método mais utilizado para decomposição de material vegetal. As amostras são solubilizadas com ácidos oxidantes concentrados ou mistura desses com peróxido de hidrogênio. Os ácidos ou as misturas mais utilizados são: HNO_3 , H_2SO_4 , HCl , HClO_4 , $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$. A maioria das amostras é totalmente oxidada, deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise. A utilização individual do ácido ou da mistura depende da natureza da amostra e do elemento a ser analisado. Este método é recomendado para determinação, dentre outros, dos elementos K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Na, Cr, Ni, V, Pb, Cd, Co e Mo. Pode também ser usado para a determinação de N, P e S, entre os não-metais. Entretanto, alguns elementos podem ser perdidos completa ou parcialmente por volatilização, aqui podendo ser incluídos os halogênios, além de Sb, As, B, Hg e Se, dependendo do procedimento utilizado.

Além dos blocos digestores, a digestão por via úmida também pode ser realizada em fornos com radiação microondas específicos para utilização em laboratórios. Esses fornos podem operar com sistemas fechados com alta pressão ou sistemas com radiação focalizada, que operam à pressão atmosférica. As microondas constituem energia eletromagnética não ionizante, que causa movimento pela migração de íons e pela rotação dos dipolos. A fonte de energia para a solubilização das amostras são ondas de rádio, de cerca de 2.450 MHz, cuja potência varia de 600 a 1.000 W.

2.3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Capela de exaustão resistente a ácidos oxidantes.
- Bloco digestor com controlador de temperatura (itens *A*, *B*, *E* e *F*).
- Forno de radiação microondas com controladores de pressão e temperatura – sistema fechado de alta pressão (item *C*).
- Forno com radiação microondas focalizadas – pressão atmosférica (item *D*).

e) Tubos de digestão em vidro borossilicato, medindo 25 x 250 mm (itens A, B, E e F).

f) Frascos de borossilicato, Teflon® ou quartzo (item C).

g) Vidrarias (pipetas, balões volumétricos, funis, etc.) (itens A a F).

Observação: A, B, C, D, E e F referem-se aos procedimentos, descritos no item 2.3.4.

2.3.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

a) Solução nitro-perclórica ($\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$), na proporção de 2:1. Misturar 400 mL de HNO_3 a 65% (v/v) + 200 mL de HClO_4 a 72% (v/v) (item A).

b) Solução nitro-perclórico-sulfúrica ($\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$), na proporção de 3:1:1 (item C).

c) Solução de peróxido de hidrogênio + ácido sulfúrico ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$), na proporção de 1:1 (item D).

d) Ácido nítrico (HNO_3) a 65% (v/v) (item B, C e D).

e) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30% (item B, C e D).

f) Ácido sulfúrico concentrado (97 a 98%).

g) Mistura catalítica: pesar 100 g de sulfato de potássio + 10,0 g de sulfato de cobre, misturar bem e triturar em almofariz.

Observação: A, B, C e D referem-se aos procedimentos, descritos no item 2.3.4.

ATENÇÃO: Lembre-se de que você está manuseando ácidos. Use os equipamentos de proteção individual: óculos, avental e luvas.

2.3.4. PROCEDIMENTOS

A) DECOMPOSIÇÃO COM MISTURA ÁCIDA: ÁCIDO NÍTRICO E ÁCIDO PERCLÓRICO

Transferir, para tubo de digestão, 0,50 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas, com peneira de

1,0 mm. Adicionar 6,0 mL do reagente 2.3.3.a., misturar bem e deixar à temperatura ambiente por aproximadamente 4 h (ou por uma noite). Colocar os tubos no bloco de digestão e aquecer gradativamente até 120°C; manter nessa temperatura até cessar totalmente o desprendimento de NO_2 (vapor castanho). Aumentar a temperatura lentamente, até atingir 210°C, temperatura que é mantida até que se obtenham fumos brancos de $\text{HClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e que o extrato se apresente incolor (± 20 min). Esfriar e completar o volume para 50,0 mL com H_2O : Nessas condições, a solução final estará em meio de HClO_4 a 0,25 mol L^{-1} .

OBSERVAÇÕES

- 1. Retirar os tubos do bloco se houver indício de perda do material.*
- 2. Não utilizar ácido perclórico em concentração superior a 72%.*
- 3. A diluição dependerá da concentração do analito na amostra, para se atingir a concentração necessária dentro da faixa analítica da técnica instrumental utilizada, podendo ser menor ou maior.*
- 4. Em algumas amostras com alto teor de sílica (p. ex., palha de arroz), ocorre extravasamento do tubo de análise, podendo provocar perdas de solução e de analito. Nesse caso, é recomendado o emprego da mistura de ácidos (item 2.3.3.c), pois o H_2SO_4 ajuda a prevenir esse problema.*

VANTAGENS

- As plantas são decompostas quase que totalmente com essa combinação de ácidos oxidantes.
- Método mais empregado para dissolução de plantas.
- O ácido nítrico modera a ação oxidante do ácido perclórico, reagindo com materiais facilmente oxidáveis, que poderiam reagir com o ácido perclórico de maneira perigosa.

LIMITAÇÕES

- a) Por ser empregado na forma oxidada e a quente, o ácido perclórico apresenta perigo de explosão quando em contato com material orgânico. Ler, por exemplo, descrição de mais de 30 casos de explosões violentas no "Handbook of Laboratory Safety", Boca Raton, CRC Press, 2nd ed., 1971. 854p.
- b) Necessidade de utilização de capelas especiais.
- c) Utilização de ácidos concentrados e de difícil aquisição, pois se trata de produtos controlados pelo Exército, pela Polícia Civil e pela Polícia Federal.
- d) Emissão de vapores tóxicos.

B) DECOMPOSIÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Transferir, para tubo de digestão, 0,50 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas, com peneira de 1,0 mm. Adicionar 4,0 mL de HNO₃ concentrado (65%), deixar em repouso por uma noite. Aquecer lentamente o bloco digestor, até 120°C, e manter nessa temperatura por 1 h. Retirar os tubos do bloco e deixar esfriar. Adicionar 4,0 mL de H₂O₂ (30%), retornar ao bloco e repetir a adição de peróxido de hidrogênio, até a solução se tornar incolor. Deixar esfriar, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água.

OBSERVAÇÃO: Mistura adequada para amostras com alto teor de carbono.

VANTAGENS

- a) Não utilização de ácido perclórico.
- b) H₂O₂ é um agente oxidante poderoso. O poder oxidante do ácido nítrico é aumentado com a utilização do peróxido de hidrogênio, que atua como agente oxidante auxiliar.
- c) H₂O₂ é comercializado com alto grau de pureza.

LIMITAÇÕES

- a) A amostra não é totalmente decomposta.
- b) Emissão de vapores tóxicos.

C) DECOMPOSIÇÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDAS EM FRASCOS DE ALTA PRESSÃO

O tecido vegetal é solubilizado com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em sistema fechado, a cerca de 180°C e pressão de 20 a 25 bar (KRUG, 2000). É importante que o equipamento seja equipado com sensores de pressão e temperatura. Pesar 0,25 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas com peneira de 1,0 mm. Transferir para frasco de decomposição adequado, fornecido pelo fabricante do equipamento (PTFE modificado, quartzo, etc.). Adicionar 5,0 mL de HNO₃ a 65% (v/v) e 2,0 mL de H₂O₂ em cada frasco. Se necessário, deixar a mistura em repouso por alguns minutos, até que diminuam eventuais reações com a amostra. Um dos frascos do equipamento deve ser reservado para o branco, em que é adicionado o mesmo volume de reagentes, sem amostra. Colocar os discos de segurança, fechar os frascos e colocá-los no carrossel, conforme descrito no manual do equipamento. Programar a rampa de aquecimento conforme o programa adequado para a amostra e iniciar a digestão. Esfriar, transferir para balão volumétrico (25 a 100 mL) e completar o volume com água.

OBSERVAÇÕES:

- 1. A proporção de amostra:ácido e o programa de aquecimento são definidos de acordo com a amostra e em função das características específicas do forno de microondas utilizado.*
- 2. Tomar sempre o cuidado de ter uma amostra no frasco de controle de pressão e temperatura para o correto controle da decomposição.*
- 3. Os polímeros modificados e o quartzo são empregados por serem materiais que não absorvem energia das*

microondas e resistem aos ácidos oxidantes a quente.

4. Em amostras com altos teores de sílica poderá ser utilizado ácido fluorídrico. nesse caso, não pode ser utilizado frasco de quartzo.

5. A diluição dependerá da concentração do analito na amostra para se atingir a concentração necessária dentro da faixa analítica da técnica instrumental utilizada, podendo ser menor ou maior.

VANTAGENS

- a) Método rápido e preciso.
- b) Menor consumo de reagentes.
- c) Mínimo de contaminação.
- d) Desprendimento de gases e vapores tóxicos é controlado.
- e) Não há perda de analitos por volatilização.
- f) Temperatura e pressão de trabalho mais elevadas.

LIMITAÇÕES

- a) Segurança (há risco de explosões).
- b) Número reduzido de amostras por análise.
- c) Limitação na massa de amostra (máximo 0,5 g).
- d) Possíveis efeitos de memória (em consequência da porosidade do frasco).
- e) Necessidade de resfriamento antes da abertura do frasco.
- f) Alto custo do forno de microondas e dos acessórios.

D) DECOMPOSIÇÃO DE PLANTAS ASSISTIDA POR MICROONDAS COM RADIAÇÃO FOCALIZADA

Pesar e transferir para frasco apropriado de 0,5 a 5,0 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas, com peneira de 1,0 mm. Operar o sistema conforme as instruções fornecidas

pelo manual de operações do equipamento. Normalmente, é utilizado maior volume de ácido do que no sistema fechado. Esses ácidos são adicionados durante a execução do programa de aquecimento. Esfriar, transferir para balão volumétrico (25 a 100 mL) e completar o volume com água.

OBSERVAÇÕES:

- 1. A utilização de frascos abertos operados sob pressão atmosférica viabiliza a programação de adição de reagentes durante o ciclo de aquecimento.*
- 2. É adequado para o tratamento de elevadas massas de amostras orgânicas que poderiam causar problemas de segurança se tratadas em sistemas fechados convencionais.*
- 3. Neste tipo de equipamento, a radiação microondas é focalizada individualmente em cada frasco, sendo o sistema equipado com sensores individuais de temperatura, permitindo o controle da temperatura em cada cavidade.*
- 4. A diluição dependerá da concentração do analito na amostra para se atingir a concentração necessária dentro da faixa analítica da técnica instrumental utilizada, podendo ser menor ou maior.*

VANTAGENS

- a) Método rápido e preciso.
- b) Maior segurança (trabalha em pressão atmosférica).
- c) Adequado para o tratamento de elevadas massas de amostra.
- d) Adição de reagentes de maneira seqüencial.
- e) Alta eficiência e controle da energia fornecida à reação.

LIMITAÇÕES

- a) Número reduzido de amostras por análise.
- b) Alto custo.

- c) Maior consumo de reagente, quando comparado com sistemas fechados.
- d) Possibilidade de contaminação.
- e) Desprendimento de gases e vapores tóxicos (recolhidos em coletores).
- f) Pode haver perda de analitos por volatilização.

E) DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA COM ÁCIDO SULFÚRICO

Pesar 0,20 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72h e moída em moinho de facas, com peneira de 1,0 mm. Transferir para tubo de digestão de 25 x 250 mm, adicionar 0,7 g de mistura catalítica ($K_2SO_4 + CuSO_4$; 10:1 – item 2.3.3.g) e 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado (2.3.3.f), levar ao bloco digestor e iniciar o aquecimento a 50°C, aumentando a temperatura gradativamente até 350°C; depois de as amostras clarearem, manter por mais 1 h no bloco digestor. O final da digestão é indicado pela coloração verde-clara da solução. Esperar esfriar e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água desionizada.

OBSERVAÇÕES:

- 1. Mistura utilizada para determinação de nitrogênio, fósforo e proteína total.*
- 2. Para diminuir o tempo de decomposição, poderá ser adicionado 1,0 mL de H_2O_2 a 30% antes de se iniciar o aquecimento.*
- 3. Para análise de nitrogênio, poderá ser destilada a amostra total. Nesse caso não há necessidade de fazer esta diluição, apenas deverão ser adicionados aproximadamente 10 mL de água desionizada para que não haja cristalização da amostra.*
- 4. A utilização de ácido sulfúrico não é recomendada para plantas com alto teor de Ca. Pode haver a formação de sulfato de cálcio ($CaSO_4$), relativamente insolúvel, reduzindo o teor de cálcio na solução e causando decréscimo no valor de outros elementos em consequência de co-precipitações.*

VANTAGENS

- a) Método adequado para grande número de amostras.
- b) Mais utilizado para a determinação de proteína-nitrogênio.

LIMITAÇÕES

- a) Desprendimento de gases e vapores tóxicos.
- b) Manuseio de ácidos corrosivos e controlados pelo Ministério do Exército, pela Polícia Civil e pela Polícia Federal.

F) DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA COM ÁCIDO SULFÚRICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Transferir, para tubo de digestão, de 0,10 a 0,30 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas com peneira de 1,0 mm. Adicionar 2,0 mL de H₂SO₄ concentrado; misturar bem. Esfriar e depois adicionar lentamente 2,0 mL de H₂O₂ a 30% pela parede do tubo, com o tubo em rotação. Aguardar o início da reação e colocar o tubo no bloco digestor. Aquecer a 350°C, até o aparecimento de fumos brancos e continuar o aquecimento por mais 30 min. Remover o tubo do bloco de digestão e deixar a amostra esfriar. Lentamente, adicionar 0,8 mL de H₂O₂ e colocar de volta no bloco digestor. Aquecer, até o aparecimento de fumos, por 20 min. Depois de o extrato ficar incolor, remover o tubo do bloco digestor, esperar esfriar, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

OBSERVAÇÕES

- 1. Mistura utilizada para determinação de nitrogênio, fósforo e proteína total.*
- 2. Se a coloração amarelada persistir, adicionar mais algumas gotas de H₂O₂ antes de transferir o extrato para balão volumétrico.*
- 3. A utilização de ácido sulfúrico não é recomendada para plantas com alto teor de Ca. Pode haver a formação*

de sulfato de cálcio (CaSO_4), que é relativamente insolúvel, reduzindo o teor de cálcio na solução e causando decréscimo no valor de outros elementos em consequência de co-precipitações.

VANTAGENS

- a) Método rápido.
- b) Adequado para grande número de amostras.

LIMITAÇÕES

- c) Desprendimento de gases e vapores tóxicos.
- d) Manuseio de ácidos corrosivos e controlados pelo Ministério do Exército, pela Polícia Civil e pela Polícia Federal.
- c) Baixo número de elementos disponibilizados para análise (devido a problemas de co-precipitação).
- d) Amostra não totalmente digerida (silicatos).

2.4. EXTRAÇÃO COM SOLUÇÃO DE ÁCIDOS DILUÍDOS ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl ou HNO_3)

2.4.1. PRINCÍPIO

Os elementos químicos do tecido vegetal são solubilizados na solução ácida diluída a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (MIYAZAWA et al., 1984). A decomposição da matéria orgânica não é completa, porém essa extração apresenta alta correlação na determinação de alguns elementos (B, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, P, Zn e NO_3^-) com outros métodos em que a decomposição da matéria orgânica é total, como a decomposição por via seca ou por via úmida (itens 2.2 e 2.3).

2.4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Banho com termostato.

Frasco de vidro borossilicato ou tubo de polietileno de 50 mL.

Agitador circular, de mesa, com controle de velocidade.

Funil de 15 mL.

Papel-filtro quantitativo, do tipo Whatman 42, de 15 mm de diâmetro.

2.4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

a) Solução com $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$ de HCl ou HNO_3 .

2.4.4. PROCEDIMENTO

Pesar, e transferir para frasco apropriado, de 0,5 g ($\pm 0,001$ g) de amostra previamente seca a 65°C por 48 a 72 h e moída em moinho de facas, com peneira de 1,0 mm. Adicionar 25,0 mL de solução com $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl ou HNO_3 e anotar a massa total. Aquecer por 15 min no banho com termostato a 80°C , agitar durante 15 min no agitador circular a 250 rpm. Esfriar, repor a água evaporada até massa inicial com água e filtrar.

OBSERVAÇÕES:

1. Método completo descrito em: Miyazawa, M., Pavan, M., Bloch, M.F.M., *Análise química de tecido vegetal, Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR, Londrina. 1992. Circular nº 74.*
2. A recuperação do P é total quando determinado em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ICP OES (altas temperaturas permitem a determinação de P orgânico, em solução, além do P inorgânico).
3. Para análise de tecido vegetal na rotina, anotar a massa total (frasco, amostra e solução ácida extratora) para facilitar a reposição da água evaporada.
4. Como alternativa, em lugar de pesar, é possível adicionar o ácido, aquecer e a seguir completar o volume em balão volumétrico, mediante diluição apropriada (25 ou 50 mL) e filtrar o extrato.
5. Seringa descartável de 10 mL pode ser utilizada em substituição ao funil, com a vantagem de ocupar menos espaço e exigir papel-filtro com menor diâmetro (15 mm), cortado com vazador de 15 cm.

VANTAGENS

- a) Menor poluição do ambiente do laboratório com gases e vapores tóxicos ou corrosivos.
- b) Não há necessidade de aparelhagem específica (como capela, mufla e bloco digestor).
- c) Simples, rápido e facilmente adaptável para análises em rotina.
- d) Baixo custo.

LIMITAÇÕES

- a) Extração parcial dos elementos Al, Fe e S.

3. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.1. NITROGÊNIO

3.1.1. SEMIMICRO KJELDAHL

3.1.1.1. PRINCÍPIO

Técnica de decomposição por via úmida, seguida por destilação a vapor e titulação para a quantificação do nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+). Proposta por Kjeldahl em 1883, a técnica permanece a mesma, com pequenas modificações. Muito utilizada para determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como de nitrogênio em plantas, para avaliação do estado nutricional. O ácido sulfúrico (H_2SO_4), na presença de K_2SO_4 (para elevar o ponto de ebulição do ácido) e de um catalisador (CuSO_4), decompõe a proteína e os aminoácidos do tecido vegetal em N-NH_4^+ . Como este é uma espécie iônica, não há problemas de perda por volatilização. A mistura é alcalinizada com NaOH aquoso e o NH_4^+ é reduzido a NH_3 , que é destilada por arraste a vapor, complexada em ácido bórico com indicador misto e titulada com solução padronizada de H_2SO_4 ou HCl (MALAVOLTA et al., 1989; MILLS & JONES, 1996).

3.1.1.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Bloco digestor.
- b) Balança analítica.
- c) Destilador semimicro de Kjeldahl.
- d) Tubo para digestão de 25 × 250 mm.
- e) Pipeta automática.
- f) Bureta de 20,0 mL.
- g) Erlenmeyer de 50,0 mL.

3.1.1.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Hidróxido de sódio, 13,0 mol L⁻¹: pesar 520,0 g de NaOH e dissolver em 1000 mL de água.
- c) Álcool etílico 99° G.L.
- d) Ácido sulfúrico concentrado, p.a. (97% a 98%).
- e) Ácido bórico a 2% (m/v): dissolver cerca de 20,0 g de ácido bórico em cerca de 800 mL de água desionizada, agitando até dissolver o sal. Após dissolução, adicionar 15,0 mL de verde de bromocresol a 0,1% (m/v), 6,0 mL de vermelho de metila a 0,1% (m/v) e 2,0 mL de NaOH a 0,1 mol L⁻¹. Completar para 1000 mL com álcool.
- f) Verde de bromocresol a 0,1% (m/v): pesar 0,1g de verde de bromocresol e dissolver em álcool etílico. Completar o volume para 100 mL com álcool.
- g) Vermelho de metila a 0,1% (m/v): pesar 0,1g de vermelho de metila e dissolver em 2 mL de álcool etílico. Completar o volume para 100 mL com água.
- h) TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) (padrão primário), 0,2 mol L⁻¹: pesar 2,4228 g de TRIS, transferir para balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água isenta de CO₂.
- i) Ácido sulfúrico, 1,0 mol L⁻¹: em balão volumétrico de 1000 mL, com aproximadamente 500 mL de água, adicionar lentamente 27,5 mL (ou 50,52 g) de ácido sulfúrico concentrado (densidade de 1,84 g cm⁻³ e 96% a 98% em massa), esperar esfriar e completar o volume com água (solução-estoque).

- j) Ácido sulfúrico, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: em balão volumétrico de 1000 mL, com aproximadamente 500 mL de água desionizada, adicionar lentamente 100 mL da solução-estoque (3.1.1.3.i) e completar o volume com água. Essa solução deverá ser padronizada com solução de TRIS (3.1.1.3.h).
- k) Padronização do ácido sulfúrico, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: em erlenmeyer de 125 mL, adicionar 10 mL de TRIS a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (3.1.1.3.h), 10 mL de solução de H_3BO_3 (3.1.1.3.e), 10 mL de água isenta de CO_2 e titular com o H_2SO_4 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (3.1.1.3.j). A concentração exata do ácido é dada pela seguinte expressão: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, em que C_1 e V_1 é a concentração e o volume do H_2SO_4 e C_2 e V_2 , a concentração e o volume de TRIS.

3.1.1.4. PROCEDIMENTO

A destilação é realizada por arraste a vapor. Em sistema de destilação, colocar, na saída do condensador, erlenmeyer de 125 mL, com 10 mL de solução de ácido bórico (item 3.1.1.3.e), e transferir alíquota de 20 mL ou toda a solução obtida da amostra solubilizada de acordo com o item 2.3.4.E. Adicionar 10 mL de solução de NaOH (item 3.1.1.3.b) e imediatamente dar início à destilação, coletando aproximadamente 35 mL de destilado. Titular com solução de ácido sulfúrico a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (item 3.1.1.3.j).

OBSERVAÇÕES:

- 1. Prova em branco deve ser feita juntamente com as amostras, para verificação de possibilidade de contaminação dos reagentes.*
- 2. 1,0 mL de H_2SO_4 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ neutraliza 2,8 mg de N.*
- 3. Método mais empregado para a determinação de proteínas e nitrogênio total em plantas.*
- 4. A saída do condensador deverá estar mergulhada na solução de ácido bórico para evitar perdas de NH_3 .*

VANTAGEM

- a) Baixo custo.
- b) Aplicável para diversos tipos de matrizes.

c) Possibilidade de automatização: no mercado já existem equipamentos de destilação automatizados.

LIMITAÇÕES

- a) Baixa velocidade analítica.
- b) Uso de reagentes corrosivos, como o ácido sulfúrico e o hidróxido de sódio.

3.1.2. ESPECTROFOTOMETRIA COM REAGENTE DE NESSLER

3.1.2.1. PRINCÍPIO

Método proposto por J. Nessler, em 1856. Aplica-se para soluções que contenham nitrogênio na forma de amônio. Fundamenta-se na reação da amônia livre com solução alcalina de iodeto de mercúrio (II) em iodeto de potássio. Essa reação produz um composto colorido, castanho-alaranjado, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de nitrogênio presente na solução; apresenta resposta linear na faixa de 5 a 40 mg L⁻¹. A reação do íon amônia com o reagente de Nessler pode ser assim representada:



3.1.2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Bloco digestor.
- b) Balança analítica.
- c) Espectrofotômetro.
- d) Tubo para digestão de 25 × 250 mm.
- e) Micropipeta automática, com volume regulável de 1,0 a 5,0 mL.
- f) Frasco de vidro do tipo “snap-cap” de 100 mL.
- g) Copos plásticos descartáveis de 50 mL.
- h) Dispensador de líquidos de 20,0 mL.
- i) Agitador de tubos.

3.1.2.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Reativo de Nessler: pesar 45,5 g de HgI_2 e 34,9 g de KI , juntar os dois reagentes e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 500 mL de água, agitando sempre até dissolver. Juntar 112,0 g de KOH previamente dissolvidos em 300 mL de água, agitar bem e completar o volume. Deixar em repouso por três dias, para decantar o sedimento, ou centrifugar a 3000 rpm. O reagente é bastante estável se armazenado em frasco escuro e arrolhado.
- c) Solução de hidróxido de sódio, $2,5 \text{ mol L}^{-1}$: pesar 100 g de NaOH , dissolver em água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água.
- d) Solução de metassilicato de sódio a 10% (m/v): pesar 100 g de Na_2SiO_3 , dissolver em água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água. A seguir, filtrar a solução utilizando papel-filtro de filtragem semilenta. Esse reagente tem a finalidade de evitar a turbidez da reação.
- e) Solução mista de hidróxido de sódio + metassilicato de sódio (1:1): misturar partes iguais das soluções de NaOH (item 3.1.2.3.c) e de Na_2SiO_3 (item 3.1.2.3.d).
- f) Solução reagente: solução mista e solução de Nessler (item 3.1.2.c.b) na proporção de 1,0 mL da solução mista e 0,5 mL da solução de Nessler. *A mistura deve ser preparada imediatamente antes da leitura.*
- g) Solução analítica de N-NH_4^+ : pesar 0,4714 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, p.a., seco em estufa a 105°C , e completar o volume até 1000 mL com água. Essa solução contém 100 mg L^{-1} de nitrogênio.
- h) Soluções analíticas: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L^{-1} de N, preparadas a partir de diluições apropriadas da solução com 100 mg L^{-1} de N.

3.1.2.4. PROCEDIMENTO

Transferir 1,0 mL do extrato (item 2.3.4.F) ou das soluções analíticas (item 3.1.2.3.h) para copos plásticos descartáveis. Adicionar 20,0 mL de água e 1,5 mL da solução de trabalho (item 3.1.2.3.f). Proceder a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 480 nm.

VANTAGENS

- a) A coloração do complexo formado é estável no intervalo de 5 min até 12 h.
- b) Não existe interferências de outros cátions (Al, Fe, Zn, Mn ou Mg).
- c) Método rápido e preciso.
- d) Alta sensibilidade.
- e) Adequado para grande número de amostras.

LIMITAÇÃO

- a) O método utiliza o metal Hg^+ , extremamente tóxico e volátil.

3.1.3. AZUL DE INDOFENOL – REAÇÃO DE BERTHELOT

3.1.3.1. PRINCÍPIO

Os compostos de nitrogênio com a digestão sulfúrica, transformam-se em NH_4^+ que, em meio alcalino, reage com NaOCl e C_6H_5OH formando o azul de indofenol, cuja coloração é proporcional à concentração de amônio presente na amostra.

3.1.3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Espectrofotômetro.
- b) Vidrarias.

3.1.3.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Solução do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA): pesar 12,7 g de $EDTA-Na_2$ e dissolver em cerca de 900 mL de água. Ajustar o pH da solução para 10,0 com solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água.
- b) Solução diluída de EDTA: pesar 3,0 g de NaOH, adicionar 30,0 mL da solução de $EDTA-Na_2$ com pH 10,0 (item 3.1.3.3.a), transferir para balão volumétrico de 2000 mL e completar o volume com água (solução A).
- c) Solução de fenol: pesar 10,0 g de fenol e 0,05 g de nitroprussiato de sódio. Dissolver em água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água (solução B).

OBSERVAÇÃO: conservar em frasco escuro e na geladeira.

- d) Solução de NaOCl: pesar 5,0 g de NaOH, 9,4 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ e 31,8 g de $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ e medir 20,0 mL de NaOCl. Misturar os reagentes, dissolver em água, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água (solução C).

OBSERVAÇÃO: conservar em frasco escuro e na geladeira.

- e) Solução analítica de $N-NH_4^+$: pesar 4,714 g de $(NH_4)_2SO_4$, p.a., seco em estufa a $105^\circ C$, e completar o volume até 1000 mL com água. Essa solução contém 1000 mg L^{-1} de N.
- f) Soluções analíticas: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 e 80,0 mg.L^{-1} de N, preparadas a partir de diluições apropriadas da solução com 1000 mg.L^{-1} de N (3.1.3.3.e).

OBSERVAÇÃO

Antes de completar o volume com água, adicionar quantidade de ácido sulfúrico concentrado de acordo com a concentração desse ácido na amostra.

3.1.3.4. PROCEDIMENTO

Diluir 10 vezes o extrato obtido no item 2.3.4.E e transferir 1,0 mL dessa solução para tubo de ensaio de 30 mL. Adicionar 7,0 mL da solução A (item 3.1.3.3.b), 1,0 mL da solução B (item 3.1.3.3.c) e 1,0 mL da solução C (item 3.1.3.3.d). Deixar reagir durante 2 h e proceder a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda igual a 630 nm. As soluções que serão empregadas como padrão para a curva de calibração deverão ser submetidas ao mesmo procedimento que o realizado com a amostra, inclusive a diluição inicial (10 vezes).

VANTAGEM

- Possibilidade de automação.
- Método altamente seletivo.

LIMITAÇÃO

- a) Utilização de fenol e nitroprussiato, compostos altamente tóxicos.

3.1.4. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO – REAÇÃO DE BERTHELOT

3.1.4.1. PRINCÍPIO

Os sistemas de análise em fluxo, conhecidos por FIA (flow injection analysis), se baseiam na injeção da amostra em um fluxo transportador (impulsionado por uma bomba peristáltica), originando uma zona de amostra reprodutível que sofre dispersão contínua durante seu transporte (RUZICKA & HANSEN, 1988). Após receber os reativos necessários para serem misturados à amostra, o fluxo é direcionado ao detector, onde são realizadas as leituras pertinentes, com base na intensidade do sinal analítico resultante. No método aqui descrito, o amônio reage com NaOCl e C₆H₅OH em meio alcalino, formando o azul de indofenol, cuja coloração é proporcional à concentração de amônio (item 3.1.3.1). No entanto, aqui o ácido salicílico é empregado em lugar de fenol, em virtude de sua menor toxidez (NOGUEIRA et al., 1996).

3.1.4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Bomba peristáltica com 8 canais.
- b) Tubos de Tygon[®], para bombeamento das soluções.
- c) Injetor-comutador de acrílico do tipo 1:3.
- d) Espectrofotômetro com célula de fluxo.
- e) Registrador potenciométrico.
- f) Tubos de polietileno (0,8 mm d. i.).

3.1.4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Ácido sulfúrico, 1,2 mol L⁻¹: 15,0 mL de H₂SO₄ concentrado, empregado como fluxo transportador (C, Fig. 1).
- c) Hidróxido de sódio, 0,75 mol L⁻¹: dissolver 30 g de NaOH em 1000 mL de água (R₁, Fig. 1).
- d) Solução de ácido salicílico-nitroprussiato, preparada em meio de NaOH a 0,35 mol L⁻¹: citrato de sódio a 5% (m/v) (para evitar precipitações de hidróxidos de metais), nitroprussiato a 0,50% (m/v) (como agente que

- catalisa a velocidade de formação do cromóforo) e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido salicílico (R_2 , Fig. 1).
- e) Solução comercial de hipoclorito de sódio, com 2,0 a 2,5% de cloro ativo (R_3 , Fig. 1).
- f) Solução-estoque de 1000 mgL^{-1} de N: dissolver 4,716g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 1000 mL de água.
- g) Soluções analíticas de trabalho, entre 5 e 100 mg L^{-1} de N, devem ser preparadas a partir de diluições apropriadas da solução-estoque (item 3.1.4.3.f).

OBSERVAÇÕES

- 1. Para prevenir diferenças entre os tempos e as temperaturas durante a digestão, as soluções analíticas devem ser preparadas seguindo o mesmo procedimento aplicado às amostras. Para isso, adiciona-se 0,0 (branco); 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mL da solução-estoque de 1000 mg L^{-1} de N em tubos de digestão, sendo em seguida adicionada a mistura catalisadora, 2,5 mL de H_2SO_4 e digerindo em bloco digestor, juntamente com cada lote de amostras (item 2.3.4.E).*
- 2. Os teores de NH_4 nas amostras são obtidos a partir da relação entre valor de absorvância x concentração.*

3.1.4.4. PROCEDIMENTO

a) Diagrama de fluxo

O diagrama de fluxos utilizado está descrito na Fig. 1. A amostra (A), obtida a partir da decomposição com ácido sulfúrico (item 2.3.4.E), é aspirada para preencher a alça de amostragem (comprimento = 10 cm, $50 \mu\text{L}$), que define o volume exato de amostra a ser introduzida no sistema, sendo o excesso descartado (D). A porção selecionada é introduzida no fluxo transportador (C, $2,0 \text{ mL min}^{-1}$), atravessa a bobina B_1 (30 cm) para uma perfeita homogeneização, recebe NaOH (R_1 , $4,0 \text{ mL min}^{-1}$), reagente ácido salicílico-nitroprussiato (R_2 , $0,6 \text{ mL min}^{-1}$) e hipoclorito (R_3 , $0,4 \text{ mL min}^{-1}$) e, após passar pela bobina de reação (B_2 , 300 cm, 37°C), a amostra processada

atinge a célula de fluxo ($\lambda = 660 \text{ nm}$), apresentando sinal proporcional ao conteúdo total de nitrogênio na amostra, sendo em seguida descartada (D).

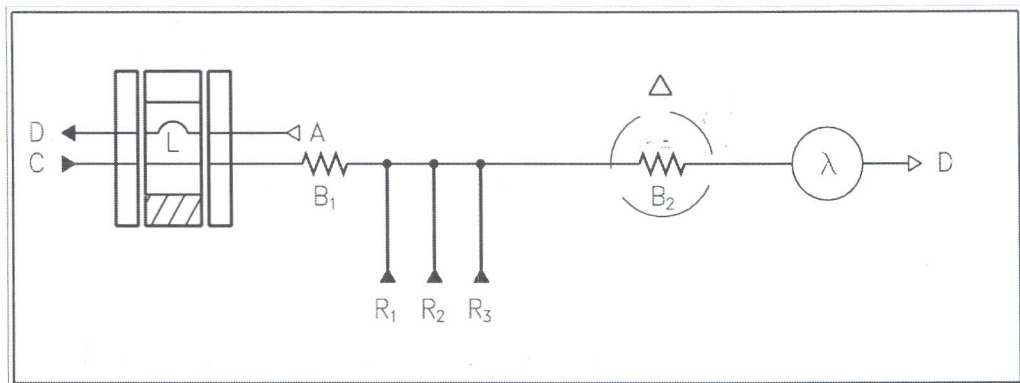


Figura 1. Diagrama de fluxos para a determinação de nitrogênio. A, amostra, C, fluxo transportador, B₁ e B₂, bobinas de reação, R₁, R₂ e R₃, reagentes, D, descarte, λ , detector, Δ , banho termostatizado. Mais informações, no texto.

VANTAGENS

- Substituição de fenol por ácido salicílico, não sendo necessário pré-tratamento da solução descartada.
- Alta velocidade analítica.
- Sistema automatizado.

LIMITAÇÕES

- Utilização de nitroprussiato, reagente tóxico.
- Altamente sensível aos valores de pH. Pequenas variações na acidez final do extrato poderão resultar em erros de análise. Este problema é contornado com o acompanhamento da curva de calibração em cada lote de análise.

3.2. FÓSFORO

3.2.1. AZUL DE MOLIBDÊNIO

3.2.1.1. PRINCÍPIO

O método está baseado na complexação do íon ortofosfato (PO_4^{3+}), em presença de ácido molíbdico (H_2MoO_4), que, em meio fortemente ácido e com um redutor apropriado (p. ex., ácido ascórbico), converte o Mo^{6+} em Mo^{3+} , produzindo o ácido fosfomolíbdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})]\cdot\text{H}_2\text{O}$), de coloração azul, devida ao molibdênio, cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade do fosfato contida na amostra, apresentando o máximo de absorção em 660 nm.

3.2.1.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Espectrofotômetro.
- b) Agitador de tubos, para homogeneização das amostras.

3.2.1.3. REGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Solução de molibdato de amônio a 2 % (m/v): dissolver 20,0 g de $(\text{NH}_4^+)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água. Em outro frasco, que contenha 500 mL de água, dissolver 2,0 g de subcarbonato de bismuto e adicionar 150 mL de H_2SO_4 concentrado. Esfriar, misturar as duas soluções e completar o volume para 1000 mL com água (solução A).
- c) Solução diluída de molibdato: transferir 300 mL da solução A (3.2.1.3.a) para frasco de 1000 mL e completar o volume com água.
- d) Solução analítica concentrada, $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P: transferir 4,3928 g de KH_2PO_4 , p.a., em frasco de 1000 mL, adicionar 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado e completar o volume com água.
- e) Soluções analíticas de trabalho: preparar soluções de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P; a partir de diluições da solução de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P.
- f) Ácido ascórbico, p.a.

3.2.1.4. PROCEDIMENTO

Transferir 5,0 mL de solução analítica de fósforo ou do extrato obtido a partir da decomposição da amostra (item 2.2, 2.3.4.A ou 2.3.4.E) para tubo de ensaio de 45 mL, adicionar 10 mL da solução diluída de molibdato (item 3.2.1.3.c), aproximadamente 40 mg de ácido ascórbico e agitar. Após 30 min, efetuar a leitura da absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm.

OBSERVAÇÃO:

Os teores de P nas amostras são obtidos a partir da relação entre valor de absorvância x concentração.

VANTAGENS

- a) Alta sensibilidade.
- b) Não utiliza reagente tóxico.

LIMITAÇÕES

- a) Baixa estabilidade do complexo fósforo-molibdico.
- b) Possível interferência de As em amostras tratadas com pesticida.
- c) Sensível a variações de acidez.

3.2.2. AMARELO DE VANADATO

3.2.2.1. PRINCÍPIO

O ânion H_2PO_4^- reage com MoO_4^{2-} e VO_3^{2-} em meio ácido, formando um complexo de coloração amarela, que absorve a luz na região de 420 nm.

3.2.2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Espectrofotômetro.
- b) Agitador de tubos, para homogeneização das soluções.

3.2.2.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Solução de molibdato a 5% (m/v): dissolver 50,0 g de $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$, p.a., em 800 mL de água quente, esfriar e completar o volume para 1000 mL com água.

- c) Solução de vanadato a 0,25% (m/v): dissolver 2,50 g de $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$, p.a., em 500 mL de água quente e adicionar 350 mL de HNO_3 a 65%, esfriar e completar o volume para 1000 mL com água.
- d) Solução reagente: misturar em partes iguais as soluções de molibdato (item 3.2.2.3.b) e de vanadato (item 3.2.2.3.c) imediatamente antes do uso
- e) Solução analítica concentrada, 1000 mg L^{-1} de P (item 3.2.1.3.d).
- f) Soluções analíticas de P: preparar soluções que contenham 0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L^{-1} de P em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, a partir de diluições da solução analítica concentrada de 1000 mg L^{-1} de P.

3.2.2.4. PROCEDIMENTO

Transferir 5,0 mL de solução analítica de fósforo ou do extrato obtido a partir da decomposição da amostra (item 2.2 ou 2.3.4.A) para tubo de ensaio de 45 mL. Adicionar 2,0 mL da mistura de reagentes (item 3.2.2.3.d). Após 10 min, efetuar a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 420 \text{ nm}$).

OBSERVAÇÕES

1. *Os teores de P nas amostras são obtidos a partir da relação entre valor de absorvância x concentração.*
2. *O método amarelo de vanadato é menos sensível que o azul de molibdênio, porém sua coloração é mais estável.*
3. *É o método mais usado para determinação de P em amostras vegetais.*

VANTAGENS

- a) Apresenta boa estabilidade do complexo formado (10 min até 24 h).
- b) Adequado para análises em rotina.
- c) Possibilidade de automação.
- d) Ausência de interferência de outros íons.
- e) Alta velocidade analítica.

LIMITAÇÃO

- a) Menor sensibilidade quando comparado ao método azul de molibdênio.

3.3. SÓDIO E POTÁSSIO

3.3.1. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA

3.3.3.1. PRINCÍPIO

Quando uma solução que contém diversas substâncias é atomizada e as minúsculas partículas da solução são projetadas sobre uma chama, há excitação dos átomos, isto é, há deslocamento de certos elétrons a níveis energéticos mais elevados; quando os átomos voltam ao seu nível energético natural, há emissão da energia absorvida na forma de radiação. Os átomos excitados do elemento de interesse emitem luz em certos comprimentos de onda discretos e característicos do elemento (p. ex., $\lambda = 766$ a 767 nm para o potássio e 589 a $589,6$ nm para o sódio). A radiação de comprimento de onda de interesse é separada da radiação emitida remanescente e sua intensidade é medida. Essa medida de intensidade pode ser relacionada diretamente com a concentração do elemento de interesse, comparando-se a intensidade medida com uma curva de calibração.

3.1.1.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- b) Fotômetro de chama.
- c) Vidrarias.
- d) Pipetas volumétricas.

3.1.1.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Solução 1000 mg L^{-1} de potássio: dissolver $1,9067 \text{ g}$ de KCl , p.a., seco em estufa a 100°C por 2 h , e completar o volume a 1000 mL com água. Armazenar em frasco de polietileno sob refrigeração.
- c) Curva de calibração de potássio: em balões volumétricos de 100 mL , transferir $0,0$, $0,5$, $1,0$, $1,5$ e $2,0 \text{ mL}$ da solução 1000 mg L^{-1} de K (3.1.1.3.b), completando o volume com solução de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . Essas soluções contêm, respectivamente, $0,0$, $5,0$, $10,0$, $15,0$ e $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de K .
- d) Solução 1000 mg.L^{-1} de sódio: dissolver $2,5421 \text{ g}$ de NaCl , p.a., seco em estufa a 100°C por 2 h , completando o volume a 1000 mL com água. Armazenar em frasco de polietileno sob refrigeração.

- e) Curva de calibração de sódio: em balões volumétricos de 100 mL, transferir 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL da solução 1000 mg.L⁻¹ de Na (item 3.1.1.3.d), completando o volume com solução de 0,25 mol L⁻¹ de HClO₄. Essas soluções contêm, respectivamente, 0,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de Na.

3.1.1.4. PROCEDIMENTO

Diluir o extrato obtido na decomposição da amostra (item 2.3.4.A), para a faixa ideal de trabalho. Como norma, em função dos teores médios de K em amostras vegetais, pode-se diluir 10 vezes. Calibrar o fotômetro de chama com as soluções analíticas 0 e 20 mg L⁻¹ de K (3.1.1.3.c). Quando da estabilização do aparelho, iniciar as leituras da curva de calibração e das amostras. A determinação de Na deverá ser realizada diretamente no extrato obtido pela decomposição da amostra (item 2.3.4.A). Calibrar o fotômetro com as soluções analíticas de 0 e 20 mg L⁻¹ de Na (item 3.1.1.3.e). Quando da estabilização do aparelho, iniciar as leituras da curva de calibração e das amostras.

OBSERVAÇÕES:

- 5. Os teores de Na e K nas amostras são obtidos a partir da relação entre a porcentagem de emissão x concentração.*
- 6. Para facilitar o trabalho, pode-se preparar curva de calibração mista (K e Na).*
- 7. Poderão ser utilizadas concentrações de até 50,0 mg L⁻¹ de Na ou K na curva de calibração, porém deve-se observar o comportamento. Se não for uma reta, deve-se utilizar a equação quadrática para calcular os resultados.*
- 8. O espectrômetro de absorção atômica deverá ser preferencialmente utilizado no modo "emissão". Porém, os custos serão mais elevados, em função da utilização de acetileno em lugar de propano (fotômetro de chama).*
- 9. ICP OES apresenta maior sensibilidade, podendo ser vantajoso seu emprego em caso de análises*

multielementares. Porém, deve ser ressaltado que os teores de Na e K em amostras de plantas são elevados, não apresentando problemas devido à sensibilidade.

VANTAGENS

- a) Alta velocidade analítica.
- b) Alta sensibilidade.
- c) Adequado para análises em rotina.

LIMITAÇÃO

- a) Estreita faixa linear (fotômetro de chama).

3.4. CÁLCIO E MAGNÉSIO

3.4.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

3.4.1.1. PRINCÍPIO

A técnica analítica se baseia na absorção de radiação das regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético por átomos no estado fundamental. O espectrômetro de absorção atômica é constituído de fonte de radiação, sistema de atomização, conjunto monocromador e detector (transdutor). A amostra é nebulizada e, em chama ar-acetileno ou oxido nitroso-acetileno, é vaporizada, produzindo átomos no estado fundamental, que podem absorver a energia radiante proveniente de uma lâmpada de catodo oco, que emite radiação com comprimento de onda específico. Os átomos absorvem essa luz, ocorrendo transição para um nível de maior energia. A intensidade dessa transição é relacionada com a concentração original dos átomos no estado fundamental.

3.4.1.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Espectrômetro de absorção atômica.
- b) Lâmpadas de catodo oco de Ca e/ou de Mg.
- c) Pipetas e balões volumétricos.

3.4.1.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Acido clorídrico concentrado (37%).
- c) Ácido perclórico a 70%.
- d) Solução de lantânio ou estrôncio a 10% (m/v): transferir 117,0 g de La_2O_3 ou 302,0 g de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para frasco de 1000 mL, adicionar lentamente 125 mL de HCl concentrado. Esfriar e completar o volume com água
- e) Solução de lantânio ou estrôncio a 0,1 % (m/v): diluir 100 vezes a solução 3.4.1.3.d.
- f) Solução analítica concentrada para absorção atômica de Ca e Mg (1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).
- g) Soluções analíticas de Ca e Mg: diluir as soluções de referência (item 3.4.1.3.f), preparando soluções com misturas de Ca (0,0, 1,0, 2,0 e 4,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e Mg (0,0, 0,2, 0,4 e 0,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Essas soluções deverão ser preparadas em meio de 0,25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido perclórico.

3.4.1.4. PROCEDIMENTO

Transferir 1,0 mL do extrato obtido mediante a decomposição da amostra (item 2) para recipiente adequado. completar o volume para 20 mL com a solução diluída de La ou Sr (item 3.4.1.3.f). verificar as condições adequadas do equipamento (item 3.7).

OBSERVAÇÕES:

- 1. Método mais utilizado para determinação de Ca e Mg.*
- 2. A adição de lantânio ou de estrôncio é necessária para a supressão da ionização do Ca e do Mg, evitando a reação com fosfato e alumínio presentes e a formação de compostos refratários, termicamente estáveis.*
- 3. ICP OES apresenta maior sensibilidade, podendo ser vantajoso seu emprego em caso de análises multielementares. Porém, deve ser ressaltado que os teores de Ca e Mg em amostras de plantas são elevados, não apresentando problemas devido à sensibilidade.*

VANTAGENS

- d) Alta velocidade analítica.
- e) Alta sensibilidade.
- f) Adequado para análises em rotina.

3.4.2. TITULAÇÃO COM EDTA

3.4.2.1. PRINCÍPIO

Cálcio e magnésio são quantificados por complexação com o sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA- Na_2), a partir da eliminação de interferentes e da utilização de diferentes complexantes e valores de pH. Negro de eriocromo T (sal sódico do ácido 2-hidróxi-2-naftilazo-6-nitronaftalinosulfônico) é empregado para a quantificação de $\text{Ca} + \text{Mg}$, em valores de $\text{pH} = 10$. Azul de eriocromo R (ácido calconcarboxílico, ou calcon) é utilizado para a determinação do Ca , após elevação dos valores de pH para 12, para precipitar o magnésio presente na solução. Fosfatos são eliminados na forma de fosfato férrico. Cobre, zinco, níquel e cobalto são mascarados com cianeto de potássio e ferro; alumínio e manganês são mascarados com trietanolamina.

3.4.2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Vidraria graduada.
- b) Bureta automática, com precisão de 0,01 mL.
- c) Agitador magnético.
- d) Papel-filtro quantitativo de filtração rápida.

3.4.2.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Solução de EDTA- Na_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$): transferir para balão volumétrico de 1000 mL, 3,7225 g de EDTA- Na_2 previamente seco em estufa entre 70 e 80°C durante 2 h e resfriado em dessecador, dissolver e completar o volume com água.
- c) Solução de negro de eriocromo T, a 0,5% (m/v): dissolver 125 mg de negro de eriocromo T em 25 mL de álcool metílico.

- d) Solução de calcon, a 1,0 % (m/v): dissolver 100 mg de calcon em 100 mL de álcool metílico.
- e) Solução com pH 10: dissolver 7 g de NH_4Cl em 58 mL de NH_4OH , adicionar 5 g de KCN (**cuidado**), 15 mL de trietanolamina e completar o volume para 100 mL com água. Armazenar em frasco plástico.
- f) Solução de cloreto férrico ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Fe^{3+}): transferir 4,8 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 2,0 mL de HCl concentrado e completar o volume com água.
- g) Solução de ácido acético a 1:1: diluir 50 mL de H_3CCOOH com 50 mL de água.
- h) Solução de vermelho de metila a 0,1 % (m/v): transferir, para balão volumétrico de 100 mL, 0,1 g de vermelho de metila, dissolver e completar o volume com álcool etílico.
- i) Solução de hidróxido de amônio a 25% (v/v): transferir, para balão volumétrico de 1000 mL, 250 mL de NH_4OH e completar o volume com água.
- j) Solução com pH 12: dissolver 20 g de NaOH em 25 mL de água, esfriar, adicionar 5 g de KCN (**cuidado**) e 15 mL de trietanolamina e completar o volume para 100 mL em balão volumétrico. Armazenar em frasco plástico.

OBSERVAÇÃO:

Cuidado, o KCN é extremamente tóxico. Em meio ácido forma HCN, volátil, sendo necessária sua utilização em meio básico para evitar maior toxicidade. Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI).

3.4.2.4 PROCEDIMENTO

- a) Transferir 50 mL da solução da amostra decomposta (item 2) para bquer de 250 mL. Para eliminação do fosfato, adicionar 3,0 mL de solução de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (item 3.4.2.3.f), 1,0 mL de solução de ácido acético (item 3.4.2.3.g), 2 gotas de solução de vermelho de metila (item 3.4.2.3.h) e adicionar solução de NH_4OH (item 3.4.2.3.i) até viragem do indicador, acrescentando mais 1 mL em excesso. Aquecer a solução e deixar em ebulição por 5 min, filtrar ainda quente e lavar com pequenas porções,

totalizando 10 mL de água a aproximadamente 80°C. Transferir o filtrado para balão volumétrico de 100 mL, esfriar e completar o volume com água (solução A).

- b) Cálcio: transferir, para erlenmeyer de 250 mL, 25,0 mL da solução A (item 3.4.2.4.a), acrescentando aproximadamente 50 mL de água e, sob agitação, 6,0 mL de solução com pH 12 (item 3.4.2.3.j) e 5 gotas de solução de calcon (item 3.4.2.3.d). Titular com solução de EDTA-Na₂ (item 3.4.2.3.b), até obtenção de cor azul estável, que indica o ponto final da titulação.
- c) Cálcio + magnésio: transferir, para erlenmeyer de 250 mL, 25,0 mL da solução A (item 3.4.2.4.a), acrescentando aproximadamente 50 mL de água e, sob agitação, 7,0 mL de solução com pH 10 (item 3.4.2.3.e) e 5 a 7 gotas de solução de negro de eriocromo T (item 3.4.2.3.c). Titular com solução de EDTA-Na₂ (item 3.4.2.3.b), até obtenção de cor azul estável, que indica o ponto final da titulação.

OBSERVAÇÃO

1) 1,0 mL de EDTA-Na₂ a 0,01 mol L⁻¹ é equivalente a 0,4 mg de Ca.

VANTAGENS

- a) Baixo custo.
- b) Boa repetibilidade.

LIMITAÇÕES

- a) Utilização de reagentes altamente tóxicos e venenosos.
- b) Método sujeito a sérios problemas de interferência.

3.5. ENXOFRE

3.5.1 TURBIDIMETRIA

3.5.1.1. PRINCÍPIO

Baseia-se na quantificação da turbidez provocada pela precipitação do íon enxofre pelo cloreto de bário, na forma de sulfato de bário (BaSO_4) (MALAVOLTA et al., 1989).

3.5.1.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro ou turbidímetro.
- Aagitador do tipo Vortex®.

3.5.1.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- Água destilada e desionizada.
- Cristais de BaCl_2 passados em peneira de 60 "mesh" (malha = 0,25 mm).
- Solução analítica concentrada de S (1000 mg.L^{-1} de S-SO_4^{2-}): pesar 5,434g de K_2SO_4 , seco em estufa, dissolver em água e completar o volume para 1000 mL.
- Soluções analíticas de enxofre (0,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg.L^{-1} de S): em balões volumétricos de 100 mL, adicionar, respectivamente, 0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mL da solução analítica concentrada de enxofre (item 3.5.1.3.c), completando o volume com água.
- Solução de HCl, 6 mol L^{-1} (com 20 mg.L^{-1} de S): dissolver 0,1087g de K_2SO_4 , seco previamente em estufa, em 200 mL de água. Em seguida, adicionar 500 mL de HCl. Agitar até completa dissolução do sal e completar o volume para 1000 mL com água.

3.5.1.4 PROCEDIMENTO

Transferir 2,0 mL do extrato obtido na decomposição da amostra (item 2.3.4.A) ou da solução analítica de S (item 3.5.1.3.d) e completar o volume para 20,0 mL com água. Em seguida, transferir 10,0 mL dessa solução para tubo de 30,0 mL, adicionando 1,0 mL da solução de HCl (item 3.5.1.3.e) e 0,5 g de BaCl_2 (item 3.5.1.3.b). Agitar vigorosamente por 30 s e, após 4 min (cronometrados), efetuar leitura no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 420 nm, ou no turbidímetro.

OBSERVAÇÃO:

A leitura deve ser realizada impreterivelmente entre 4 e 8 min, uma vez que o precipitado de $BaSO_4$ decanta-se rapidamente.

VANTAGEM

Baixo custo.

LIMITAÇÃO

Baixa sensibilidade.

3.6 COBRE, ZINCO, FERRO E MANGANÊS

3.6.1. PRINCÍPIO

O tecido vegetal pode ser decomposto por via úmida (item 2.3) e a determinação do elemento é realizada diretamente no extrato por espectrometria de absorção atômica.

3.6.1.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Espectrômetro de absorção atômica, com lâmpada de catodo oco de Cu, Zn, Fe e Mn.

3.6.1.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- Água destilada e desionizada.
- Soluções de ácido clorídrico: $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.
- Solução analítica concentrada de cobre (com 100 mg L^{-1} de Cu): dissolver $0,393 \text{ g}$ de $CuSO_4 \cdot 5 \cdot H_2O$ em solução de HNO_3 a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.
- Solução analítica concentrada de ferro (com 100 mg L^{-1} de Fe): pesar e dissolver $0,702 \text{ g}$ de sulfato ferroso amoniacal $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ em 50 mL de água desionizada que contenha $10,0 \text{ mL}$ de H_2SO_4 concentrado e completar o volume para 1000 mL com água desionizada.
- Solução analítica concentrada de manganês (com 100 mg L^{-1} de Mn): pesar $0,31 \text{ g}$ de $MnSO_4 \cdot H_2O$ e dissolver em solução de HNO_3 a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, completando o volume para 1000 mL .

- f) Solução analítica concentrada de zinco (com 100 mg L^{-1} de Zn): pesar e dissolver $0,440 \text{ g}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em solução de HNO_3 , $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, completando o volume para 1000 mL com esta solução.

OBSERVAÇÃO

Para evitar problemas devidos a contaminações e/ou alterações no estado físico-químico dos sais, recomenda-se o uso de soluções analíticas concentradas disponíveis no comércio.

- g) Curva de calibração mista de cobre, ferro, manganês e zinco: a partir das soluções analíticas concentradas (itens 3.6.1.3.c, d, e, f), transferir, para balão volumétrico de 100 mL , alíquotas apropriadas para que a curva de calibração final se encontre dentro da faixa linear respectiva de cada elemento, completando o volume, mantendo-se a mesma condição de acidez final das amostras.

3.6.1.4 PROCEDIMENTO

Para cada elemento, calibrar o equipamento com a curva de calibração mista (item 3.6.1.3.g) e proceder às leituras diretamente no extrato obtido a partir da decomposição da amostra (item 2.3). Verificar o alinhamento da lâmpada e a adequação da chama (item 3.7).

3.7. REGRAS BÁSICAS PARA MANUTENÇÃO DE ROTINA EM ESPECTRÔMETROS DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Instrumentos em boas condições de operação devem ser considerados prioridade em qualquer laboratório de análises. Para isso, é necessário implantar um programa de manutenção (manutenção geral do instrumento, manutenção no fornecimento de gás, manutenção dos componentes da chama e manutenção dos componentes do forno), visando ao aumento da vida útil do instrumento, ao tempo de parada reduzido e à melhoria geral no

o desempenho do instrumento, dando ao operador maior confiança na validade de seus resultados analíticos. Este tópico foi extraído no manual operacional da Embrapa Pecuária Sudeste.

7.1. MANUTENÇÃO GERAL DO INSTRUMENTO

Poeira e vapores condensados podem se acumular no invólucro do instrumento e líquidos corrosivos podem espirrar no instrumento. Para minimizar os danos, limpe o instrumento com pano macio, úmido, usando água ou solução detergente fraca. Não use solventes orgânicos. Nas janelas do compartimento da amostra e nas janelas da lâmpada podem se acumular poeira ou marcas digitais. Nesses casos, limpe as janelas com pano macio embebido com álcool isopropílico. Se as janelas não estiverem limpas, o operador observará sinais de ruído das lâmpadas e resultados analíticos não reproduzíveis. Evitar a instalação do equipamento em locais onde haja alta concentração de poeira e vapores. O equipamento não deverá ser exposto à incidência direta de raios do sol e a corrente elétrica deverá ser estabilizada, visando ao aumento da vida útil dos componentes eletrônicos. Os componentes óticos vedados deverão ser limpos por especialistas da assistência técnica autorizada.

7.2. MANUTENÇÃO DO FORNECIMENTO DE GÁS

A chama tem a finalidade de transformar íons e moléculas em átomos no estado fundamental. Os gases mais apropriados para uso em espectrometria de absorção atômica por chama são o ar ou o óxido nitroso, empregados como gases de suporte da combustão, e o acetileno, empregado como gás combustível. Cada gás é fornecido ao instrumento por meio de sistema de fornecimento dotado de tubos e mangueiras de borracha. Tubulação de cobre pode ser utilizado para os gases oxidantes e o acetileno só deve ser fornecido por meio de tubulação de aço inoxidável. Verificar regularmente as conexões da rede de gases, para prevenir possíveis vazamentos, especialmente quando os cilindros são trocados, usando solução de detergente ou mistura de etanol e água.

O tipo de chama mais utilizado em espectrometria de absorção atômica é a mistura ar-acetileno, numa proporção relativamente elevada de oxidante em relação ao combustível (chama azul). A mudança na proporção oxidante: combustível pode alterar o equilíbrio e pode melhorar significativamente a eficiência de atomização. A chama redutora (amarela) é obtida aumentando-se a quantidade de acetileno em relação ao ar, promovendo aumento da pressão parcial de uma série de produtos da combustão (por exemplo, CO); isso facilita a atomização de elementos com tendências de formação de óxidos refratários. Por outro lado, a chama oxidante (azul clara) é obtida diminuindo a quantidade de acetileno em relação ao ar, o que favorece aqueles elementos cuja eficiência de atomização se dá pela formação de óxidos.

Quanto à manutenção, deve-se verificar se as mangueiras de borracha ligadas ao instrumento estão gastas ou rachadas. Além disso, a cada troca de carga dos gases, verificar se os reguladores e as válvulas estão funcionando corretamente. Por serem usados ou produzidos gases potencialmente tóxicos na chama, é necessário usar um sistema de exaustão apropriado, com capacidade mínima de $6 \text{ m}^3/\text{min}$, ou o recomendado pelo fabricante do instrumento.

3.7.3. AR COMPRIMIDO

O ar pode ser fornecido ao instrumento a partir de cilindros ou de um compressor de ar, sendo os cilindros fonte mais dispendiosa. Se for utilizado ar comprimido produzido por um compressor, um conjunto de filtro e regulador na linha de entrada para o instrumento deverá ser instalado. O fornecimento deve ter pressão de entrada de 60 psi e o ar deve ser limpo, seco e livre de óleo. Excesso de ruído na leitura poderá ser atribuído ao ar contaminado. O conjunto de filtro de ar constitui um componente essencial do espectrômetro de absorção atômica e sua inclusão na instalação de fornecimento de ar é obrigatória. Semanalmente, verifique se o filtro contém acúmulo de partículas e de umidade. Quando necessário, desmonte o conjunto de filtro de ar e limpe o elemento filtrante, o vaso e os componentes da válvula de drenagem.

3.7.4. ACETILENO

O acetileno é o único gás combustível normalmente usado em espectrometria de absorção atômica por chama. O gás deve ser empacotado em acetona e ter grau de pureza de pelo menos 99,6% e especificação "grau AA". A pressão de entrada deve ser regulada e nunca exceder 15 psi. Verificar o manual de operações do instrumento para que a pressão seja corrigida em conformidade com as exigências do fabricante. Verificar diariamente a pressão do cilindro de acetileno, evitando que seja inferior a 100 psi, para impedir que a acetona entre na linha de gás, provocando degradação dos resultados analíticos e causando danos ao instrumento.

3.7.5. ÓXIDO NITROSO

O óxido nitroso usado para a espectrometria de absorção atômica por chama deve ser livre de óleo. Se não for usado um regulador aquecido, pode ocorrer a perda da regulagem, devida ao efeito de expansão por resfriamento. Isto pode levar a resultados errados e criar o potencial para uma situação de retorno de chama com unidades de controle manual de gás.

3.7.6. MANUTENÇÃO DOS COMPONENTES DA CHAMA

A manutenção dos componentes da chama deve ser rotineira, para garantir o bom desempenho do seu equipamento. Esses componentes são divididos em nebulizador, câmara de aspersão e queimador.

3.7.7. ATOMIZAÇÃO POR CHAMA

O atomizador é uma parte de extrema importância na espectrometria de absorção atômica, pois neste dispositivo serão formados os átomos que absorverão a radiação proveniente da lâmpada de catodo oco e em função disso será determinada a concentração do elemento de interesse. O atomizador de chama mais comum possui um dispositivo chamado nebulizador, que pode ser constituído por uma agulha de metal ou um sistema de vidro. Em qualquer dos casos, a função do nebulizador é formar um aerossol da

solução aquosa que se deseja analisar. Esse aerossol é constituído por pequenas gotículas que entram em uma câmara de nebulização e chegam ao queimador arrastado pelos gases (combustível e oxidante). O nebulizador normalmente é constituído em aço inoxidável e o queimador em titânio, para resistir às elevadas temperaturas. A parte interna da câmara de nebulização deve ser de material inerte à corrosão, podendo ser metálico ou plástico (OLIVEIRA et al., 2000).

A área do nebulizador do componente de chama consiste do tubo capilar e do corpo do nebulizador. Tenha sempre cuidado para que o tubo capilar usado para aspirar as soluções esteja corretamente adaptado ao capilar do nebulizador. Quaisquer vazamentos de ar, curvaturas estreitadas ou pancadas causarão leituras instáveis, não reproduzíveis. Algumas vezes o tubo capilar de plástico pode entupir e será necessário cortar a seção entupida ou adaptar novo pedaço de tubo capilar. Em qualquer caso, deve-se verificar com cuidado, para ter certeza de que o tubo capilar esteja corretamente adaptado ao capilar do nebulizador. Este também pode apresentar entupimento. Se isto ocorrer, proceda da seguinte maneira: apague a chama; remova o tubo capilar de polietileno; remova o nebulizador de sua base e desmonte-o, conforme descrito no manual de operação do instrumento. Coloque o nebulizador em um limpador ultrassônico que contenha solução de detergente líquido a 0,5 % (Triton X-100®). Se este procedimento não for eficaz, passe um arame de nebulizador livre de aparas cuidadosamente através do nebulizador e em seguida repita o procedimento de limpeza ultra-sônica; monte e instale novamente o nebulizador de acordo com as instruções. Caso formem bloqueios e se eles não forem removidos, o sinal analítico cairá continuamente até que não se observe nenhuma absorbância. Os problemas com o nebulizador podem ser minimizados tendo-se o cuidado de sempre aspirar de 50 a 500 mL de água no final de cada dia de trabalho.

3.7.8. CÂMARA DE ASPERSÃO

Quando a amostra sai do nebulizador, ela vai de encontro à esfera de impacto e se divide em gotículas do tipo aerossol. A eficiência da esfera

pode ser comprometida pela ocorrência de ranhuras superficiais, nas quais poderá ocorrer acumulação de material sólido. A redução na eficiência da esfera de impacto pode causar diminuição nos valores de absorbância e ruídos no sinal analítico. Ao remover o nebulizador para inspeção, certificar-se de que o mecanismo de ajuste funcione adequadamente e que a esfera esteja posicionada corretamente sobre a saída do nebulizador.

Juntamente com o nebulizador e a esfera de impacto, a câmara de aspersão e o retentor de líquido devem também ser removidos para limpeza, com detergente neutro e água. Enxaguar completamente com água desionizada e secar todos os componentes. Encher novamente o retentor de líquidos e montar a câmara de aspersão, verificando possíveis deformações nos anéis de vedação ou nos bloqueios das entradas de gás. Verificar diariamente o nível do rejeito, descartá-lo num tanque de armazenagem, para posterior tratamento dos resíduos.

3.7.9. QUEIMADOR

O componente final de interesse do sistema da chama é o queimador. Durante a aspiração de certas soluções, podem se formar depósitos de carvão e/ou sais no queimador, causando alteração na razão combustível: oxidante e no perfil da chama, corte potencial do feixe ótico e degradação do sinal analítico. Para minimizar o acúmulo de sais, uma solução diluída de ácido nítrico pode ser aspirada entre as amostras. Se os sais continuarem a se acumular, desligar a chama e usar a tira de limpeza fornecida com o instrumento. Introduza a tira na abertura do queimador e mova-a para trás e para a frente através da abertura. Isto deve deslocar quaisquer partículas que serão então afastadas logo que a chama seja acesa e a água aspirada. Não use objetos afiados, tais como lâminas de barbear para limpar o queimador, pois podem causar ranhuras na abertura, formando áreas onde os sais e o carvão possam se acumular em velocidade acelerada. Se este tipo de limpeza não for eficiente, remova o queimador, inverta-o e embeba-o em água morna com sabão. Uma escova facilitará a limpeza. Também pode ser embebido em solução de ácido nítrico a 0,5% (v/v). Uma alternativa para a limpeza são os banhos ultra-sônicos com detergente não-iônico diluído. Após a limpeza, enxágüe-o completamente com água desionizada

e seque antes de instalá-lo no instrumento. Nunca desmonte o queimador para limpeza, pois se for montado incorretamente ocorrerá vazamento de misturas gasosas, com potencial para causar explosões. Esta manutenção deve ser feita semanalmente.

Após o término das análises, deve-se aspirar de 50 a 100 mL de água desionizada, para limpar o nebulizador, a câmara de aspersão e o queimador.

3.7.10. PROGRAMA DE MANUTENÇÃO PERIÓDICA

Diariamente

- Verificar o gás,
- Verificar o sistema de exaustão,
- Esvaziar o receptáculo de drenagem,
- Limpar as janelas do compartimento de amostra e
- Enxaguar a câmara de aspersão com 100 mL de água destilada.

Semanalmente

- Desmontar a câmara de aspersão e verificar a esfera de impacto e os componentes do nebulizador e
- Lavar a câmara de aspersão e o retentor de líquidos, limpar o queimador, trocar o líquido do retentor, verificar os anéis de vedação, verificar o conjunto de filtros de ar e limpar o instrumento com pano.

No momento da troca dos gases

Verificar vazamentos, pressão dos reguladores e mangueiras de fornecimento de gás.

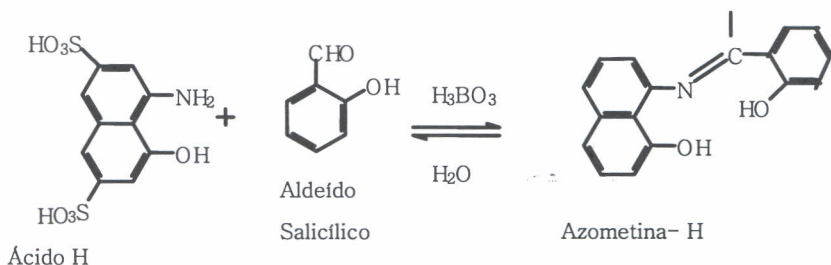
3.8. BORO

3.8.1. AZOMETINA-H

3.8.1.1. PRINCÍPIO

Técnica de espectrometria de absorção molecular, cuja determinação é baseada na formação de um complexo de coloração amarela resultante da

reação do ácido bórico com o reagente azometina-H (WHO, 1998, WOLF, 1971). Em soluções aquosas, o reagente é amarelado e se dissocia de acordo com a seguinte reação (WOLF, 1971):



O ácido bórico desloca o equilíbrio para a esquerda, aumentando a intensidade da coloração amarela proporcionalmente à concentração de boro. Esse deslocamento é relativamente lento.

3.8.1.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Cadinho de porcelana.
- b) Forno do tipo mufla.
- c) Tubos de ensaio de polipropileno.
- d) Espectrofotômetro VIS.

3.8.1.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Ácido clorídrico, 0,1 mol L⁻¹: dissolver 8,3 mL de HCl concentrado em 1000 mL com H₂O destilada. Armazenar em frasco plástico.
- c) Solução de ácido ascórbico-L a 1%: pesar e dissolver 1 g de ácido ascórbico-L em 100 mL de água.
- d) Solução-tampão: pesar e dissolver 500 g de acetato de amônio e 30 g de EDTA em 800 mL de água. Adicionar lentamente 250 mL de ácido acético glacial e homogeneizar.
- e) Solução de azometina-H: dissolver 0,45 g de azometina-H em 100 mL da solução de ácido ascórbico (item 3.8.1.3.a). Esta solução deve ser preparada semanalmente, armazenada em frasco escuro e conservada no refrigerador.
- f) Solução analítica concentrada de boro (50,0 mg L⁻¹): dissolver 0,286 g de ácido bórico em HCl a 0,1 mol L⁻¹, completar o volume para 1000 mL com o ácido. Armazenar em frasco plástico.

g) Curva de calibração: transferir, para balões volumétricos de 100 mL, 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL da solução analítica concentrada e completar o volume com HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, guardando em frascos plásticos. Essas soluções contêm, respectivamente, 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 mg L^{-1} de boro.

3.8.1.4. PROCEDIMENTO

3.8.1.4.1. Preparo do extrato

Incinerar 250 mg da amostra, seca e moída, a 500°C durante cerca de 2 h. Dissolver as cinzas com 10 mL de solução de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Homogeneizar.

3.8.1.4.2. Determinação

Transferir, para tubos de ensaio de polipropileno, alíquota de 2,0 mL da curva de calibração ou da amostra. Juntar 2,0 mL da solução-tampão e homogeneizar. Adicionar 2,0 mL da solução de azometina-H a 0,45% e agitar. Após 30 min, transferir as soluções amarelo-avermelhadas para tubos do espectrofotômetro e proceder às leituras em filtro azul, em 420 nm, acertando o zero do aparelho com HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

VANTAGENS

- a) Método rápido e preciso.
- b) Alta sensibilidade.

LIMITAÇÕES

- a) Alto custo operacional.
- b) Uso de reagentes tóxicos e irritantes (azometina-H).

3.8.2. CURCUMINA

3.8.2.1. PRINCÍPIO

O método fundamenta-se na reação entre o ânion borato e a curcumina em presença de ácido oxálico, havendo a formação de um composto, constituído predominantemente de rubrocurcumina, solúvel em álcool etílico e medido espectrometricamente (WHO, 1998, WOLF, 1971).

3.8.2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Cadinhos de porcelana.
- b) Forno do tipo mufla.
- c) Copos plásticos.
- d) Banho termostatisado.
- e) Centrífuga.
- f) Espectrofotômetro.

3.8.2.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- a) Água destilada e desionizada.
- b) Ácido clorídrico, 0,1 mol L⁻¹: ver item 3.8.1.3.b.
- c) Álcool etílico 96°G.L.
- d) Curcumina.
- e) Ácido oxálico.
- f) Ácido clorídrico.
- g) Solução de álcool etílico 96°GL, livre de boro.
- h) Solução de curcumina em ácido oxálico: dissolver 0,04 g de curcumina finamente moída e 5,0 g de ácido oxálico em 100 ml de álcool etílico a 95%. Guardar em frasco escuro em refrigerador (preparar semanalmente).
- i) Solução analítica concentrada de boro (50,0 mg.L⁻¹): ver item 3.8.1.3.f.
- j) Curva de calibração: ver item 3.8.1.3.g

3.8.2.4. PROCEDIMENTO

3.8.2.4.1. Preparo do extrato

Ver item 3.8.1.4.1.

3.8.4.2. Determinação

Transferir 1,0 mL do extrato ou da curva de calibração para frascos plásticos de 50 mL. Juntar 4,0 mL da solução de curcumina em ácido oxálico e misturar. Colocar os frascos em banho-maria e mantê-los a $55 \pm 3^{\circ}\text{C}$, de modo que a parte que contenha as soluções fique uniformemente mergulhada. Alternativa: colocar os frascos em estufa na mesma temperatura.

Deixar secar e conservar os frascos com as amostras no banho por mais 15 min. Retirar os frascos e esfriar em temperatura ambiente. Juntar exatamente

25 mL de álcool etílico (95% – 96%), friccionando com bastonete de vidro com ponta de borracha até dissolver todo o resíduo.

Transferir as soluções para tubos do espectrômetro e ler (até 1 – 2 h após), usando filtro verde (540 nm), acertando o zero com solução de HCl a 0,1 mol L⁻¹.

VANTAGENS

- a) Alta sensibilidade.
- b) Método preciso.

LIMITAÇÃO

O extrato deve ser lido no máximo até 60 min após a estabilização da coloração.

4. SISTEMA POLIVALENTE PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM ANÁLISE DE PLANTAS

4.1. PRINCÍPIO

O sistema polivalente por injeção em fluxo consiste na utilização de um único sistema capaz de realizar diferentes determinações. Não são necessárias modificações no módulo de análise para a determinação de um ou outro elemento. O sistema polivalente foi projetado para determinação de ferro, cobre, manganês, zinco, cálcio, magnésio e fósforo em plantas. As medidas espectrofotométricas podem ser realizadas após apropriadas modificações dos reagentes, das suas concentrações, do volume de amostra injetada e/ou do comprimento de onda (SILVA et al., 1998a,b).

A determinação do ferro total baseia-se na reação entre o Fe(II) e a o-fenantrolina, após prévia redução do Fe(III) do digerido por ácido ascórbico. A determinação de cobre explora o efeito catalítico dos íons cúpricos na oxidação dos íons férricos pelo tiosulfato. A coloração avermelhada do complexo intermediário $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]_2^-$ decresce proporcionalmente à concentração de cobre do digerido.

A formaldoxima atua como reagente cromogênico para determinação de manganês. Em meio alcalino, ela forma solução avermelhada com os íons Mn (II). Como o ferro torna-se uma espécie potencialmente interferente, emprega-se o KCN, pois complexa o ferro sem afetar o sinal analítico do composto Mn-formaldoxima formado.

A determinação de zinco baseia-se na formação do complexo azul Zn-Zincon®.

A o-cresoltaleína complexona (CPC) é o reagente cromogênico utilizado nas determinações de cálcio e magnésio, após adição de ácido bis(aminoetil)glicoeter-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) ou oxina e solução-tampão adequada para melhoria na seletividade. A presença de ferro em concentrações $> 10 \text{ mg L}^{-1}$ conduz à redução pronunciada do sinal analítico do magnésio. Para minimizar esse efeito, a adição de 3,0% (m/v) de KCN ao reagente R1 deve ser empregada e nessa situação a concentração de ferro tolerada é de aproximadamente 50 mg L^{-1} .

A determinação do fósforo baseia-se na metodologia do amarelo de indofenol. Em meio ácido, o fósforo reage com os íons do reagente R1 para formar um complexo amarelo. Esta reação apresenta sensibilidade e seletividade adequadas para análises de plantas.

4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) Bomba peristáltica com 8 canais
- c) Tubos de Tygon®, para bombeamento.
- d) Injetor-comutador de acrílico, do tipo 1:3.
- e) Espectrofotômetro com célula de fluxo.
- f) Registrador potenciométrico.
- g) Tubos de polietileno (0,8 mm d. i.).

4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções devem ser preparadas com reagentes químicos de grau analítico e água destilada e desionizada.

A matéria orgânica é mineralizada por via seca: 0,25 g de tecido vegetal seco, finamente moído e peneirado é incinerado e os resíduos são

recuperados em 5,0 mL de 1,0 mol L⁻¹ de HCl e diluídos 5 vezes com água, apresentando concentração final aproximada de 0,2 mol L⁻¹ de HCl, sendo esta a concentração utilizada no fluxo transportador (C, Fig. 1).

Considerando-se os teores esperados de zinco, cobre, manganês, ferro, cálcio, magnésio e fósforo dos digeridos, curvas de calibração mistas são preparadas em 0,2 mol L⁻¹ de HCl contendo de 0,00 a 2,00 mg L⁻¹ de Zn, Cu e Mn + 0,0 a 10,0 mg L⁻¹ de Fe e Mg + 0,0 a 16,0 mg.L⁻¹ de P-PO₄, + 0,0 a 40,0 mg L⁻¹ de Ca. As soluções-estoque são de 1000,0 mg.L⁻¹ de Zn, Cu, Fe ou Ca (com base em ZnSO₄, CuCl₂, FeCl₃·2H₂O ou CaCO₃, em HCl) e de 250,0 mg.L⁻¹ de Mg ou P (MgSO₄·7H₂O ou KH₂PO₄).

Ferro: R₁ (Fig. 2) – solução com 2,0% (m/v) de ácido ascórbico, preparada diariamente e estocada em frasco escuro; R₂ – solução com 2,0 mol L⁻¹ de acetato de amônio mais 0,25% (m/v) de 1,10 o-fenantrolina (fen), preparada a partir da solubilização de 15,42 g de NH₄CH₃COOH + 0,25 g de fen em 100 mL de água, e R₃ – água.

Cobre, R₁ – solução com 0,10 mol L⁻¹ de tiosulfato de sódio, preparada a partir da solubilização de 2,48 g Na₂S₂O₃ em 100 mL de água; R₂ – água e R₃ – solução com 0,05 mol L⁻¹ de sulfato férrico, preparada a partir da solubilização de 1,3 g de FeCl₃·2H₂O em 100 mL de água.

Zinco, R₁ – solução com 2,0% (m/v) de ácido ascórbico, preparada diariamente e estocada em frasco escuro; R₂ – solução com 0,5 mol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ + 0,7 mol L⁻¹ de NaOH + 0,5% (m/v) de KCN, preparada a partir da solubilização de 2,80 g de NaOH + 0,5 g de KCN + 10,1 g de Na₂B₄O₇ em aproximadamente 80 mL de água quente sob agitação, ajustando o pH para 9,4 (2,0 mol L⁻¹ de NaOH ou 6,0 mol L⁻¹ de HCl) e completando-se o volume para 100 mL com água e R₃ – solução com 0,04% (m/v) de Zincon® (2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzeno) + 0,37% (m/v) de formaldeído, preparada pela solubilização de 0,04 g de Zincon® e 1,0 mL de solução-estoque com 37% (m/v) de formaldeído padronizado.

Manganês, R₁ – solução com 2,0% (m/v) de ácido ascórbico, R₂ – solução com 2,0 mol L⁻¹ de NaOH + 3,0% (m/v) de KCN, dissolvidos em água, e R₃ – solução com 0,5 mol L⁻¹ de formaldoxima, preparada pela solubilização de

7,0 g de cloreto de hidroxilamina + 3,0 mL de formaldeído a 37% (m/v), em 100 mL de água.

Cálcio, R₁ – solução com 0,5 mol L⁻¹ de NaOH + 3,0% (m/v) de KCN, R₂ – solução-tampão (0,5 mol L⁻¹ de NH₃-NH₄, pH = 10,5) preparada pela solubilização de 26,7 g de NH₄Cl + 20,0 g NaOH em cerca de 800 mL de água, ajustando-se o pH para 10,5 e completando-se o volume com água para 1.000 mL, e R₃ – solução com 0,01% (m/v) de o-cresolftaleína complexona (CPC) + oxina a 0,2% (m/v), preparada pela dissolução de 0,002 g de CPC e 0,4 g de oxina em 2,0 mL de 5,0 mol L⁻¹ de HCl, completando o volume para 200 mL com água.

Magnésio, R₁ – solução com 0,5 mol L⁻¹ de NaOH + 3,0% (m/v) de KCN, R₂ – solução-tampão (0,5 mol L⁻¹ de NH₃-NH₄, pH = 10,5) + 4,5.10⁻³ mol L⁻¹ de EGTA + 5,0.10⁻³ mol L⁻¹ de BaCl₂.2H₂O, preparada pela solubilização de 20,0 g de NaOH + 26,7 g de NH₄Cl + 1,21 g de BaCl₂.2H₂O + 1,71 g de EGTA em 1000 mL de água e R₃ – solução com 0,03% (m/v) de CPC.

Fósforo, R₁ – água; R₂ – solução com 1,6% (m/v) de molibdato de amônio, preparada pela dissolução de 16,0 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O em aproximadamente 800 mL de água quente e completando-se o volume para 1000 mL com água, e R₃ – solução com 0,08% (m/v) de metavanadato de amônio, preparada pela dissolução de 0,80 g de (NH₄)VO₃ em água quente, adicionando-se 112,0 mL de HNO₃ concentrado e completando-se o volume para 1.000 mL com água.

4.4. PROCEDIMENTO

O diagrama de fluxos é mostrado na Fig. 2. O comprimento da alça de amostragem L, através da qual a amostra é aspirada (4,0 mL.min⁻¹), é de 50 cm (cerca de 250 µL) para Fe, Cu, Zn e Mn, de 20 cm (cerca de 100 µL) para P e Mg, ou de 10 cm (cerca de 50 µL) para determinação de Ca. Após modificação da posição do injetor-comutador, a alíquota da amostra selecionada é introduzida no fluxo transportador (4,0 mL min⁻¹). A zona de

amostra estabelecida recebe os reagentes R_1 , R_2 e R_3 ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$), passa pelas bobinas B_1 , B_2 e B_3 (30, 50 e 300 cm) e alcança a unidade de detecção. A passagem da amostra processada através da célula de fluxo resulta em um sinal transiente proporcional à concentração do analito contido na amostra, monitorado no comprimento de onda adequado (Tabela 1). Após o registro do sinal analítico, o injetor-comutador retorna à posição inicial na Fig. 2, para que nova alíquota da amostra seja introduzida no fluxo transportador.

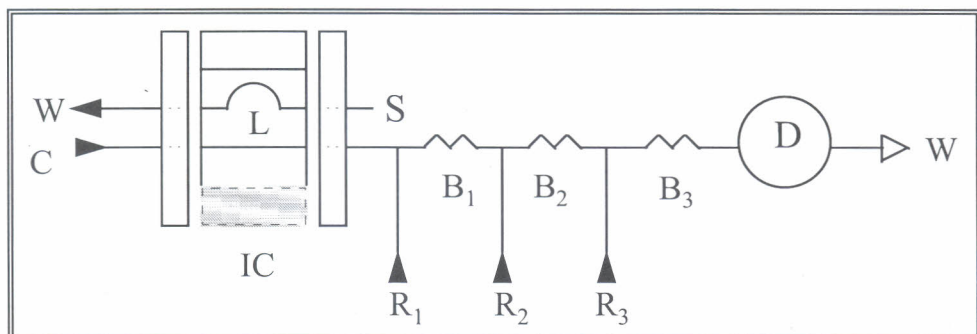


Figura 2. Sistema polivalente por injeção em fluxo. IC = injetor-comutador, A = amostra; L = alça de amostragem; C = fluxo transportador ($4,0 \text{ mL min}^{-1}$); R_1 , R_2 , R_3 = reagentes ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$); B_1 , B_2 , B_3 = bobinas de reação (30, 50, 200 cm); D = detector, W = descarte. Linha pontilhada = posição alternativa do IC com a movimentação da porção central; setas = direção de bombeamento. Outras indicações sobre as dimensões do sistema encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações dos reagents, comprimento de onda, linearidade e equações de calibração para determinação de Fe, Cu, Mn, Zn, Ca, Mg e P em plantas por sistema polivalente por injeção em fluxo.

Elemento	L ¹ cm	λ nm	linearidad e mg L ⁻¹	R ₁ 1,0 mL min ⁻¹	R ₂ 1,0 mL min ⁻¹	R ₃ 1.0 mL min ⁻¹
Ferro	50	512	até 10,0	2,0 % (m/v) ácido ascorbico	0,25 % (m/v) fen + 2,0 M NH ₄ OAc	H ₂ O
Zinco	50	630	2,0	2,0 % (m/v) ácido ascorbico	0,5 % (m/v) KCN + 0,7 mol L ⁻¹ NaOH + 0,5 mol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇	0,04 % (m/v) Zincon + 1,0 % (m/v) HCHO + 0,02 mol L ⁻¹ NaOH
Manganês	50	455	2,0	2,0 % (m/v) ácido ascorbico	3,0 % (m/v) KCN + 2,0 mol L ⁻¹ NaOH	0,5 mol L ⁻¹ formaldoxina
Cobre	50	550	2,0	0,10 mol L ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃	H ₂ O	0,050 mol L ⁻¹ Fe (III)
Cálcio	10	575	30,0	0,5 mol L ⁻¹ NaOH + 3,0 % (m/v) KCN	0,5 mol L ⁻¹ NH ₃ /NH ₄ (pH 10,5)	0,01 % (m/v) CPC + 0,2 % (m/v) oxina
Magnésio	20	570	10,0	0,5 mol L ⁻¹ NaOH + 3,0 % (m/v) KCN	0,0045 mol L ⁻¹ EGTA + 0,005 mol L ⁻¹ Ba (II) + 0,5 mol L ⁻¹ NH ₃ /NH ₄ (pH 10,5)	0,03 % (w/v) CPC
Fósforo	20	420	30,0	H ₂ O	1,6 % (m/v) (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,08 % (m/v) (NH ₄)VO ₃

1. Alça de amostragem – diâmetro 0,8 mm.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16 ed., Arlington, 1995. v.1, cap.3.
- KRUG, F.J. Métodos de Decomposição de Amostras. IN: **III Workshop sobre Preparo de Amostras**. São Carlos, SP. 2000. 148p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A., **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989, 201p.
- MILLS, H.A.; JONES JR., J.B. **Plant Analysis Handbook II. A practica sampling, preparation, analysis, and interpretation guide**. 2.ed., Athens, Georgia: Micro-Macro Publishing, Inc., 1996. 422p.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M. Determination 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 Plant Analysis**, 15, 141 (1984).

- NOGUEIRA, A.R.A., SOUZA, G.B., BATISTA, L.A.R., Determinação Espectrofotométrica de Nitrogênio em Digeridos de Plantas em Sistema de Análise por Injeção em Fluxo. **Química Nova**, v.19 (1), p.33-36,1996.
- OLIVEIRA, P.V., KRUG, F.J., NÓBREGA, J.A, **Espectrometria de Absorção Atômica**. Apostila- Curso em Análise Química. Piracicaba, 2000.
- QUEVAUVILLER, P. Conclusions of the Workshop- improvements of trace element determination in plant matrices. **Science Total Enviromental**, Brussels. v.176, p.141-148, 1995.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**, 2 ed.New York: John Wiley, 1988, 497p.
- SILVA, F.V., NOGUEIRA, A.R.A., SOUZA, G.B., ZAGATTO, E.A.G. A polyvalent flow injection system for multielemental, spectrophotometric analysis of plant material. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p.39-46, 1998a.
- SILVA, F.V., SOUZA, G.B., NOGUEIRA, A.R.A., **Utilização de sistemas de análise por injeção em fluxo em laboratório de nutrição animal: Sistema polivalente para determinação multielementar em plantas**. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1998b, 27p. (Boletim de Pesquisa, 3).
- WHO. **Boron Environmental health criteria**. No.204. A WHO monograph. Geneva - Switzerland: World Health Organization, 1998.
- WOLF, B. The determination of boron in soil extracts, plant materials, composts, manures, water and nutrient solutions, **Soil Science and Plant Analysis**, 2 (5) 363-374 (1971).