

BOLETIM DE PESQUISA Nº 03

ISSN 0104-7701
Dezembro, 1998

*Utilização de sistemas de análise por injeção em fluxo em
laboratório de nutrição animal: Sistema polivalente para
determinação multielementar em plantas*

Fernando Vitorino da Silva

Gilberto Batista de Souza

Ana Rita de Araujo Nogueira



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Tiragem: 300 exemplares

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

13560-970 São Carlos, SP

Telefone (016) 261-5611

Fax (016) 261-5754

E-mail: webmaster@cppse.embrapa.br

Site: <http://www.cppse.embrapa.br>

SILVA, F.V. da ; 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 análise de plantas. São Carlos: EMBRAPA - CPPSE, 1998. 27p. (EMBRAPA-CPPSE. Boletim de Pesquisa, 3)

1. Química analítica - Espectrofotometria - Análise I. SOUZA, Gilberto Batista de. Colab. II. NOGUEIRA, Ana Rita de Araujo. Colab. III. EMBRAPA. Centro de Pesquisa de Pecuária Sudeste (São Carlos, SP). IV. Título. V. Série.

Sumário

Pág.

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Soluções	12
2. Sistema polivalente por injeção em fluxo	15
3. Procedimento	18
RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
1. Aspectos específicos dos procedimentos analíticos	19
2. Avaliação do efeito de interferentes	23
3. Aplicações analíticas	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
AGRADECIMENTOS	30

UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO EM LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: SISTEMA POLIVALENTE PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM PLANTAS

Fernando Vitorino da Silva¹

Gilberto Batista de Souza²

Ana Rita de Araujo Nogueira³

RESUMO

É proposta a utilização de sistema polivalente por injeção em fluxo, que consiste na utilização de um único sistema capaz de realizar diferentes determinações. Seu uso é particularmente atrativo em laboratórios que processam grande número de amostras, com vários elementos a serem determinados. O sistema foi aplicado para determinação espectrofotométrica de ferro, cobre, manganês e zinco (micronutrientes), e cálcio, magnésio e fósforo (macronutrientes) em plantas. Não foram necessárias modificações no módulo de análise para a determinação de um ou outro elemento, sendo alterados apenas os comprimentos de onda e os volumes de amostra. Foram observadas somente pequenas variações nas equações de calibração (< 3%) após 4 h consecutivas de trabalho e os resultados apresentaram-se concordantes com outra técnica analítica (espectrofotometria de absorção atômica) e

¹ Bacharel em Química, aluno de Mestrado do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

² Técnico de Nível Superior, Embrapa Pecuária Sudeste.

³ Pesquisador, Embrapa Pecuária Sudeste

amostras-padrão certificadas. Com a utilização deste sistema, proposto para análises em larga escala, pode-se ter um exemplo da estabilidade, da simplicidade, da robustez e da versatilidade inerentes aos sistemas por injeção em fluxo.

ABSTRACT

A polyvalent flow injection system consisting of a single manifold suitable to perform different determinations after only minor adaptations was conceived. Its use is particularly attractive for laboratories processing a large number of samples including several analytes. The system was applied to spectrophotometric determination of iron, copper, manganese and zinc (micronutrients) as well as calcium, magnesium and phosphorus (macronutrients) in plants. With the proposed system, slight variations in the coefficients of the calibration equations (usually $< 3\%$) were found after 4-hour working periods. Results were precise ($0.8\% < \text{r.s.d.} < 4.3\%$) and in agreement with certified values of standard reference materials. The system was designed for spectrophotometric large scale analyses. Results emphasize stability, simplicity, robustness and versatility inherent to flow systems.

INTRODUÇÃO

A necessidade de obtenção de resultados analíticos confiáveis, no menor tempo possível, em diversas áreas da Ciência, tem proporcionado o desenvolvimento de novas técnicas analíticas. Um exemplo que pode ser citado são os laboratórios de análises de solos e plantas e de ciências ambientais, onde normalmente é manipulado grande número de amostras e os resultados devem ser rápidos e corretos. Essa demanda tem motivado o desenvolvimento de instrumentação e metodologias analíticas, entre as quais podem ser destacados os sistemas de análises químicas por injeção em fluxo, bastante eficientes por permitirem respostas a diferentes problemas analíticos em diversos campos.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis - FIA) (Ruzicka & Hansen, 1988) 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. Após receber os reativos necessários para serem misturados à amostra, o fluxo é direcionado ao detector, onde são realizadas as leituras pertinentes, por meio da altura do sinal analítico resultante. Como características favoráveis desta metodologia, salientam-se a alta velocidade de amostragem, o baixo consumo de amostras e reagentes, a obtenção de resultados exatos de maneira pronta, a facilidade de automação e a versatilidade. O grande número de aplicações e publicações surgidas atestam sua aceitação em laboratórios de análises automatizadas (Ruzicka & Hansen, 1988).

Em laboratórios de nutrição vegetal, as requisições para a determinação de ferro, cobre, manganês, zinco, cálcio, magnésio e fósforo são freqüentes (Mortvedt, 1991; Mills & Jones Junior, 1996) e um grande número de procedimentos analíticos por injeção em fluxo já foi proposto (Ruzicka & Hansen, 1988; Mortatti et al., 1982; Fukasawa et al., 1987; Giné et al., 1979; Koupparis & Anagnostopoulou, 1986; Nogueira et al., 1996; Oliveira et al., 1996; Liu et al., 1995), sendo que a tendência observada é o desenvolvimento de um sistema diferente para cada elemento que se deseja analisar. Assim, um sistema polivalente pode ser projetado e alguns dos procedimentos previamente estabelecidos foram adaptados de forma que, com mínimas modificações, as diferentes determinações pudessem ser feitas. As medidas espectrofotométricas foram realizadas após apropriadas modificações dos reagentes, suas concentrações, volume de amostra injetada e/ou comprimento de onda.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar a possibilidade de um único sistema poder determinar alguns dos maiores e menores constituintes de plantas. Para aumento na facilidade de implantação destes sistemas, métodos espectrofotométricos foram acoplados a um único sistema de análise por injeção em fluxo, permitindo a realização de diferentes determinações sem modificação do módulo de análise.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Soluções

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

A matéria orgânica foi destruída após mineralização por via seca, conforme procedimento oficial (AOAC, 1995; Mills & Jones Junior, 1996): 0,25 g (base seca) de planta seca e peneirada foram queimados, 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 (Mills & Jones Junior, 1996), soluções-padrão mistas foram preparadas em 0,2 mol L⁻¹ de HCl contendo: 0,00 - 2,00 mg L⁻¹ de Zn; 0,00 - 2,00 mg L⁻¹ de Cu; 0,00 - 2,00 mg L⁻¹ de Mn; 0,0 - 10,0 mg L⁻¹ de Fe; 0,0 - 10,0 mg L⁻¹ de Mg; 0,0 - 16,0 mg L⁻¹ de P-P04 e 0,0 - 40,0 mg L⁻¹ de Ca.

As soluções-estoque foram de 1000,0 mg L⁻¹ de Zn, Cu, Fe ou Ca (com base em ZnSO₄, CuCl₂, FeCl₃.2H₂O e CaCO₃, em HCl); e de 250,0 mg L⁻¹ de Mg e P (MgSO₄.7H₂O e KH₂PO₄).

Determinação de ferro:

R₁ (Fig. 1): solução 2,0% (m/v) de ácido ascórbico preparada diariamente e estocada em frasco escuro;

R₂: solução 2,0 mol L⁻¹ de acetato de amônio mais 0,25 % (m/v) 1,10 o-fenantrolina (fen), preparada a partir da solubilização de 15,42 g de NH₄CH₃CO₂ + 0,25 g de fen em 100 mL de água;

R₃: água.

Determinação de cobre:

R₁: solução 0,10 mol L⁻¹ de tiosulfato de sódio, preparada a partir da solubilização de 2,48 g de Na₂S₂O₃ em 100 mL de água;

R₂: água;

R₃: solução 0,05 mol L⁻¹ de sulfato férrico, preparada a partir da solubilização de 1,35 g de FeCl₃·2H₂O em 100 mL de água.

Determinação de zinco:

R₁: solução 2,0% (m/v) de ácido ascórbico, preparada diariamente e estocada em frasco escuro;

R₂: solução 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, pH ajustado para 9,4 (2,0 mol L⁻¹ de NaOH ou 6,0 mol L⁻¹ de HCl) e volume completado para 100 mL com água;

R₃: solução 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 37% (m/v) de formaldeído padronizado (Merck, 1996).

Determinação de manganês:

R₁: solução 2,0% (m/v) de ácido ascórbico;

R₂: solução 2,0 mol L⁻¹ de NaOH + 3,0% (m/v) de KCN, dissolvidos em água;

R₃: solução 0,5 mol L⁻¹ de formaldoxima, preparada pela solubilização de 7,0 g de cloreto de hidroxilamina + 3,0 mL de formaldeído 37% (m/v), em 100 mL de água.

Determinação de cálcio:

R₁: solução 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) - 26,7 g de NH₄Cl + 20,0 g de NaOH em ca 800 mL de água, pH ajustado para 10,5 e volume completado para 1000 mL com água;

R₃: solução 0,01% (m/v) de o-chresoltaleina complexona (CPC) + oxina 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 e o volume completado para 200 mL com água.

Determinação de magnésio:

R₁: solução 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 ácido bis(aminoetil)glicoeter- N,N,N',N'-tetraacético (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;

R₃: solução 0,03% (m/v) de CPC.

Determinação de fósforo:

R₁: água;

R₂: solução 1,6% (m/v) de molibdato de amônio, preparada pela dissolução de 16,0 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em aproximadamente 800 mL de água quente e o volume completado para 1000 mL com água;

R₃: solução 0,08% (m/v) de metavanadato de amônio, preparada pela dissolução de 0,80 g de $(\text{NH}_4)\text{VO}_3$ em água quente, adicionados de 112,0 mL de HNO_3 conc. e o volume completado para 1000 mL com água.

2. Sistema Polivalente por Injeção em Fluxo

O sistema por injeção em fluxo consiste de uma bomba peristáltica com oito canais e tubos de Tygon® para bombeamento, um injetor-comutador de acrílico do tipo 1:3 (Reis et al., 1980), um espectrofotômetro VIS com célula de fluxo (volume interno *ca* 80 μL , caminho ótico de 12 mm) e um registrador potenciométrico. As conexões foram feitas por meio de confluências e tubos de polietileno (0,8 mm d.i.).

O diagrama de fluxos é mostrado na Fig. 1. O comprimento da alça de amostragem L, por meio da qual a amostra é aspirada (4,0 mL min^{-1}), é de 50 cm (*ca* 250 μL) para Fe, Cu, Zn e Mn, 20 cm (*ca* 100 μL) para P e Mg, e 10 cm (*ca* 50 μL) para determinação de Ca. Após a introdução da amostra, o injetor-comutador é deslocado de posição (Fig. 1) e 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, para que nova alíquota da amostra seja introduzida no fluxo transportador.

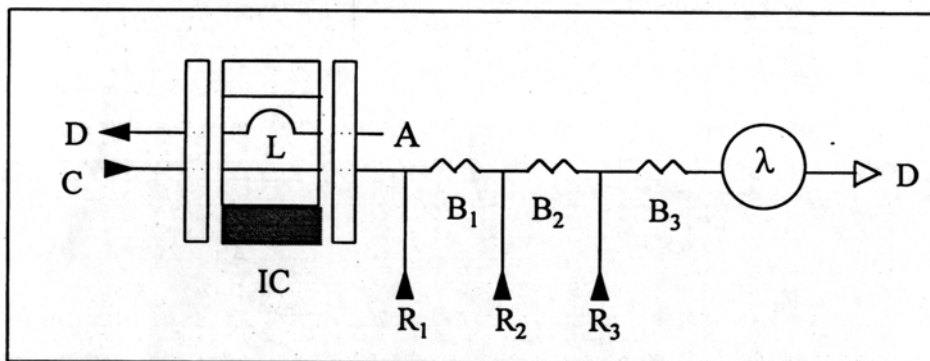


Figura 1. Sistema polivalente por injeção em fluxo. IC - injetor-comutador, A - amostra; L - alça de amostragem; C - fluxo transportador ($4,0 \text{ mL min}^{-1}$); R_1 , R_2 , R_3 - reagentes ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$); B_1 , B_2 , B_3 - bobinas de reação (30, 50 e 200 cm); λ - detector; D - descarte. 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 reagentes, comprimento de onda, linearidade e equações de calibração, Para determinação de ferro, cobre, manganês, zinco, cálcio, magnésio e fósforo em plantas por sistema polivalente por injeção em fluxo.

Elemento	L ¹ cm	λ nm	Linearidade 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 ascórbico	0,25% (m/v) fen + 2,0 mol L ⁻¹ NH ₄ OAc	H ₂ O
Zinco	50	630	2,0	2,0% (m/v) ácido ascórbico	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 ascórbico	3,0% (m/v) KCN + 2,0 mol L ⁻¹ NaOH	0,5 mol L ⁻¹ formaldoxima
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)	0,03% (m/v) CPC
Fósforo	20	420	30,0	H ₂ O	1,6% (m/v) (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂	0,08% (m/v) (NH ₄)VO ₃

¹ Alça de amostragem

3. Procedimento

O comprimento das bobinas e a razão entre o fluxo transportador e os fluxos confluentes foram experimentalmente definidos de modo a proporcionarem boas condições de mistura em todos os procedimentos adotados. Os comprimentos selecionados para as alças de amostragem, que representam o volume de amostra introduzido, encontram-se definidos na Tabela 1.

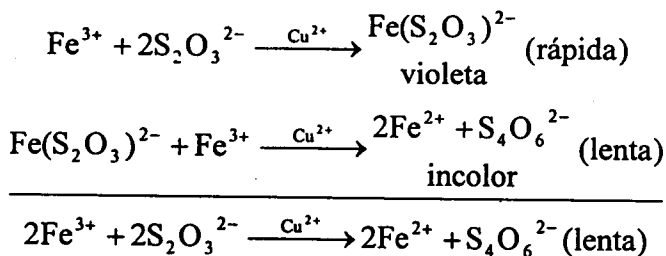
Após definição das características físicas do sistema, as características analíticas de todos os procedimentos foram avaliadas, com a utilização de material de referência certificado e por comparação com outra técnica analítica (espectrometria de absorção atômica). O sistema foi submetido e aprovado para publicação em revistas científicas (Nogueira et al., 1997; Silva et al., 1998) e implantado em linha de rotina no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. Aspectos específicos dos procedimentos analíticos

A determinação do ferro total foi baseada na reação entre o Fe(II) e a o-fenantrolina, após prévia redução do Fe (III) do digerido por ácido ascórbico. As concentrações e as composições dos reagentes, previamente definidas (Mortatti et al., 1982), foram adaptadas ao sistema polivalente por injeção em fluxo da Fig. 1, e a o-fenantrolina foi misturada com o tampão acetato. Devido à alta vazão do fluxo transportador, a concentração do tampão acetato de amônio foi de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Esta concentração utilizada conferiu acidez adequada ao meio para a reação se processar. Neste procedimento, uma redução quantitativa do Fe (III) foi conseguida. Além disso, experimentos envolvendo o uso de amostras em "situação de volume infinito" (Krug et al., 1986) e parada de fluxo revelaram o total desenvolvimento da reação, produzindo a ferroína colorida.

A determinação de cobre foi baseada no efeito catalítico dos íons cúpricos na oxidação dos íons férricos pelo tiossulfato (Fukasawa et al., 1987). A coloração avermelhada do complexo intermediário $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]^{2-}$ decresce proporcionalmente à concentração de cobre do digerido. A seqüência de reações, apresentada abaixo, apresenta sensibilidade adequada para análise de plantas.

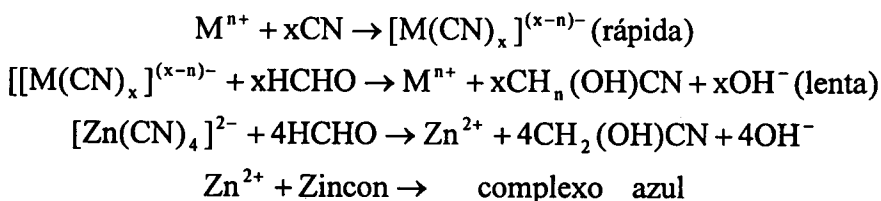


Dentre os procedimentos desenvolvidos, este foi o único a explorar o decréscimo do sinal analítico. O reagente Fe(III) foi introduzido após a bobina B₂, para minimizar os desvios da linha base e para que modificações na configuração física do sistema fossem evitadas, água foi empregada como R₂. Como compromisso entre sensibilidade analítica e linearidade da curva de calibração, 0,10 mol L⁻¹ de Na₂S₂O₃ e 0,05 mol L⁻¹ de Fe(III) foram as concentrações fixadas para os reagentes R₁ e R₃, respectivamente.

Formaldoxima foi eleita como reagente cromogênico para determinação de manganês. Em meio alcalino, ela forma uma solução avermelhada com os íons Mn (II) (Giné et al., 1979). Para se evitar a interferência de ferro, foi empregado cianeto de potássio, que complexa o ferro sem afetar o sinal analítico do complexo Mn-formaldoxima formado. A presença da bobina B₂ força a formação dos ciano-complexos de ferro, aumentando a ação mascarante do KCN.

A determinação de zinco foi baseada na formação do complexo azul Zn-Zincon. Um leve meio alcalino, pH 8,5 - 9,0, foi necessário, pois este reagente também reage com cobre no intervalo 5,5 - 9,5 da escala de pH (Oliveira et al.,

1996). Com referência à seletividade, potenciais interferentes foram mascarados com cianeto e os aspectos cinéticos desta reação foram, então, explorados na determinação de zinco. Os ciano-complexos de zinco formados são os primeiros a serem destruídos pelo formaldeído e, desse modo, os íons de Zn(II) ficam livres para reagir com o Zincon (Koupparis & Anagnostopoulou, 1986; Oliveira et al., 1996; Liu et al., 1996):



Dentro da bobina B₂ (Fig. 1), o zinco e os outros metais formam prontamente os ciano-complexos em pH 9,0. O Fe(III) e o Cu(II) foram previamente reduzidos na bobina B₁, porque a estabilidade dos ciano-complexos de Fe(II) e Cu(I) é superior à dos ciano-complexos formados com as respectivas formas oxidadas. Dentro da bobina B₃, os ciano-complexos de zinco foram destruídos pelo formaldeído, ficando os íons de Zn(II) livres para reagir com o Zincon. A concentração de trabalho ideal para o formaldeído foi fixada em 0,37% (v/v).

O reagente cromogênico para as determinações de cálcio e magnésio foi a CPC, após adição de EGTA ou oxina e solução tampão adequada para melhoria na seletividade (Nogueira et al., 1996). O sistema tampão foi escolhido para manter o pH do meio em torno de 10,5. Como compromisso

entre seletividade, estabilidade do sistema e ruído da linha base, foi decidido adicionar hidróxido de sódio como reagente R_1 . No entanto, a principal melhoria em sensibilidade e seletividade foi conseguida pela adição de íons bário ao reagente R_2 . A constante de estabilidade condicional do complexo Ba-EGTA ($\log_{Ba} X = 8,4$) está entre a dos complexos Ca-EGTA ($\log_{Ca} X = 11$) e Mg-EGTA ($\log_{Mg} X = 5,4$) formados (Wada et al., 1983). Desse modo, após a adição de bário a formação do complexo Mg-EGTA foi evitada, melhorando-se a sensibilidade, como pode ser deduzido das equações:

$$y = 0,00992 x - 2,22 \cdot 10^{-17}, r = 0,995, n = 7 \text{ (sem bário)}$$

$$y = 0,0367 x - 0,0165, r = 0,997, n = 7 \text{ (com bário)}.$$

A presença de ferro em concentrações superiores a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ conduz a redução pronunciada do sinal analítico do magnésio. Para minimizar este efeito, a adição de 3,0% (m/v) de KCN ao reagente R_1 foi testada, e verificou-se a supressão da interferência do ferro quando o comprimento da bobina de reação B_1 foi igual a 50 cm. Como a adição desta bobina ao caminho analítico não afetou o desempenho dos outros procedimentos, decidiu-se adicionar uma bobina de 50 cm entre os reagentes R_1 e R_2 , e nesta situação a concentração de ferro tolerada foi de aproximadamente $50,0 \text{ mg L}^{-1}$.

A determinação do fósforo foi baseada na metodologia oficial (AOAC, 1995). Em meio ácido, o fósforo reage com os íons do reagente R_1 , para formar um complexo amarelo. Essa reação apresenta sensibilidade e seletividade

adequadas para análises de plantas.

2. Avaliação do efeito de interferentes

O uso de soluções-padrão mistas aumenta a versatilidade do sistema polivalente, porque somente um conjunto de soluções para análise de sete nutrientes é empregado. Estudos realizados demonstraram que os elementos não interferem entre si.

O sinal analítico foi pouco afetado pela presença de elementos potencialmente interferentes como Al, Na e K. A adição de 200,0 mg Na L⁻¹; 200,0 mg K L⁻¹ e 5,0 mg Al L⁻¹ em uma mistura (6,0 mg Fe L⁻¹; 1,5 mg Cu L⁻¹; 1,5 mg Mn L⁻¹; 1,5 mg Zn L⁻¹; 40,0 mg Ca L⁻¹; 10,0 mg Mg L⁻¹ e 16,0 mg P L⁻¹, respectivamente) apresentou como resultado interferência positiva na determinação de Ca e Mg, devido a adição de Na (+ 4,6 e + 0,6%) e K (+ 2,2 e + 3,5%) e interferências na determinação de Zn respectivamente, positiva, devido a adição de Al (+ 2,3%) e negativa, devido a adição de K (- 2,3%).

Variações na acidez da amostra (70% ou 130% de 0,2 mol L⁻¹ HCl) e/ou adição de sulfato, Ni, Mo, Co e B (em níveis acima dos esperados para o digerido), não provocaram modificações consideráveis no sinal analítico. Considerando que os valores das concentrações estudadas de Na, K e Al estavam acima dos valores esperados para os digeridos (levando em conta os níveis normalmente encontrados em materiais vegetais (Mills & Jones Junior, 1996) e o procedimento de preparo da amostra), o sistema polivalente

proposto é aplicável a análises em larga escala sem restrições.

3. Aplicações Analíticas

Após o estabelecimento das concentrações e dos volumes injetados, o sistema foi aplicado a amostras reais. Alta precisão nas medidas de altura de pico foram registradas. A precisão foi avaliada em termos do desvio-padrão relativo dos resultados após o processamento de 10 amostras típicas. Os desvios padrão relativos, foram: 2,1%, Fe; 1,0%, Cu; 2,2%, Mn; 4,3%, Zn; 1,0%, Ca; 0,6%, Mg; e 3,5%, P. Os limites de detecção foram determinados em 0,09 mg Fe L⁻¹; 0,24 mg Cu L⁻¹; 0,09 mg Mn L⁻¹; 0,17 mg Zn L⁻¹; 1,5 mg Ca L⁻¹; 0,21 mg Mn L⁻¹; e 0,68 mg P-PO₄⁻ L⁻¹. A frequência analítica foi determinada em 83 h⁻¹ para o P, 90 h⁻¹ para o Cu; 120 h⁻¹ para o Zn, e em torno de 150 h⁻¹ para Mn, Ca e Mg, sendo que os diferentes valores encontrados são devidos às variações no tempo de residência médio, que dependem da velocidade de formação (ou enfraquecimento) da cor. Resultados precisos foram obtidos, como confirmado na análise do material de referência certificado. Para algumas amostras, os resultados foram comparados com os obtidos por espectrometria de absorção atômica (Welz, 1985) (Tabelas 2 e 3) e, após comparação de médias pela aplicação do teste-t, nenhuma diferença significativa entre os métodos foi encontrada ao nível de 5% de probabilidade. Pequenas variações nos coeficientes das equações das curvas de calibração (normalmente < 3%) foram observados após período de 4 horas de trabalho.

Quando o sistema polivalente proposto foi aplicado a análises em larga escala, não foram notados maiores problemas, enfatizando a simplicidade, a robustez e a versatilidade inerente ao sistema de análise em fluxo.

Tabela 2. Resultados comparativos. Teores de ferro, cobre, manganês e zinco (mg kg^{-1} , com base na matéria seca); em folhas de planta, determinados pelo sistema polivalente proposto (SP) e por espectrometria de absorção atômica (EAA) (Welz, 1985). As incertezas estão baseadas em três repetições.

Amostra	Fe			Cu			Mn			Zn		
	SP	EAA	SP	SP	EAA	SP	SP	EAA	SP	SP	EAA	EAA
1	148±3	144±4	36,5±1	36,0±0,8	62±1	61±2	46,8±0,8	49±1				
2	135,9±0,8	142±3	25±1	28±1	138±3	139±2	15±1	17,1±0,9				
3	947±7	905±6	5,8±0,8	7,0±0,4	130±2	128±2	48,9±0,9	50,3±0,3				
4	156±4	178±3	38±3	41±2	63,7±0,9	59±1	46±1	48±2				
5	35±2	30±2	4,7±0,6	4,1±0,2	14,7±0,5	15,1±0,8	23±1	23±2				
6	255±9	224±3,0	17±2	18,4±0,8	147±2	148±1	17,9±0,7	18±1				
Material	valor		valor		valor		valor		valor		valor	
Certificado	certif.		certif.		certif.		certif.		certif.		certif.	
Apple leaves (NIST 1515)	94±6	(80,0) ^a	5±2	5,64±0,24	72±2	82±3	15±1	12,50±0,3				
Spinach leaves (NIST 1570a)	-	-	13,4±0,6	12,20±0,60	53±4	54±3	82,3±0,8	82±3				
r ^b	0,9986		0,9948		0,9960		0,9978					

^a desvio padrão não disponível,

^b coeficiente de correlação entre os dois conjuntos de dados analíticos.

Tabela 3. Resultados comparativos. Teores de cálcio, magnésio e fósforo (g kg^{-1} , com base na matéria seca); em folhas de planta, determinados pelo sistema polivalente proposto (SP) e por espectrometria de absorção atômica (EAA) (Welz, 1985). As incertezas estão baseadas em três repetições.

Amostra	Ca			Mg			P	
	SP	EAA	SP	SP	EAA	SP	SP	EAA
1	22±1	20,6±0,8	2,8±0,7	3±1,0	5,9±0,2	6,8±0,5		
2	12,3±0,5	11,6±0,2	3,3±0,9	3,4±0,6	1,3±0,1	1,4±0,3		
3	11±2	12±1	3,3±0,6	3,0±0,4	4,6±0,2	4,5±0,3		
4	31±1	30,7±0,6	4,1±0,7	3,9±0,9	1,7±0,2	1,4±0,1		
5	5,4±0,3	5,1±0,1	1,9±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1	1,9±0,2		
6	11,9±0,2	12,3 ^a	4,3±0,3	4,1±0,5	1,2±0,1	1,3±0,3		
Material	valor		valor		Valor		Certif.	
Certificado	certif.		certif.		Certif.		Certif.	
Apple leaves ^b (NIST 1515)	1,5±0,1	1,526±0,015	0,29±0,01	0,271±0,08	0,14±0,05	-		
Spinach leaves (NIST 1570a)	1,82±0,01	1,527±0,041	0,85±0,03	(0,89) ^c	0,49±0,01	0,518±0,011		
r^d	0,9977		0,9917		0,9903			

^a medida de dispersão não detectada;

^b (%) = $\text{mg kg}^{-1} \cdot 10^{-4}$;

^c desvio padrão não disponível;

^d coeficiente de correlação entre os dois conjuntos de dados analíticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**, 16. ed., Arlington, 1995. v.1, cap.3.
- FUKASAWA, T.; KAWAKUBO, S.; TAN, L. Catalytic determination of copper(II) using the iron(III)-thiosulphate reaction and its application to metals and biological samples. **Analyst**, v. 112, p.1247-1251, 1987.
- GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN FILHO, H. Semi-automatic determination of manganese in natural waters and plant digests by flow injection analysis. **Analyst**, v.104, p.371-375, 1979.
- KOUPPARIS, M.A.; ANAGNOSTOPOULOU, P.I. Automated flow injection spectrophotometric determination of zinc using zincon: applications to analysis of waters, alloys and insulin formulations. **Analyst**, v. 111, p.1311-1315, 1986.
- KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Commutation in flow injection analysis. **Analytical Chimica Acta**, v. 179, p.103-106, 1986.
- LIU, R.; LIU, D.; SUN, A.; LIU, G. Simultaneous determination of copper and zinc in the hair of children by pH gradient construction in a flow-injection system. **Analyst**, v.120, p.569-572, 1995.
- MERCK, **The Index Merck**, 12.ed. Whitehouse Station, New Jersey, 1996. p.4262-4263.
- MILLS, H.A.; JONES JUNIOR, J.B. **Plant analysis handbook II. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide**. 2. ed., Athens, Georgia: MicroMacro, 1996.
- MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; PESSENDA, L.C.R.; ZAGATTO, E.A.G.; JOERGENSEN S.S. Flow injection spectrophotometric determination of iron in plant material and natural waters with 1-10-phenantroline. **Analyst**, v.107, p.659-665, 1982.

MORTVEDT, J.J. ed. **Micronutrients in agriculture**, 2. ed. Madison, Wisconsin: Soil Sci. Soc. Am., 1991. 760p.

NOGUEIRA, A.R.A.; BRIENZA, S.M.B.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; ARAUJO, A.N. A flow injection system with multi-site detection for spectrophotometric determination of calcium and magnesium in soil extracts and natural waters. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n.1, p.165-169, 1996.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B.; SILVA, F.V.; ZAGATTO, E.A.G. Sistema polivalente de análises químicas por injeção em fluxo: determinação espectrofotométrica de cálcio, magnésio e fósforo em plantas. **Scientia agricola**, Piracicaba, v.54, p.209-216, 1997:

OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R.P.; REIS B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Multicommution in flow analysis. IV. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. **Analytical Chimica Acta**, v. 332, p. 173-178, 1996.

REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; KRUG, F.J. ; BERGAMIN FILHO, H. Merging zones in flow injection analysis. 4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant material. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, p. 305-311, 1980.

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 materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p.39-46, 1998.

WADA, H.; YUCHI, A.; NAKAGAWA, G. Spectrophotometric determination of magnesium by flow injection analysis with a ligand buffer for masking calcium. **Analytica Chimica Acta**, v. 149, p. 291-296, 1983.

WELZ, B. **Atomic absorption spectrometry**. 2.ed., Weinheim: VHC Public., 1985, 505p.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no projeto de pesquisa "Desenvolvimento de metodologias analíticas para aplicações em estudos de nutrição e metabolismo animal", nº 12.0.95.010, da Embrapa Pecuária Sudeste. Recebeu também auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - proc. 94/0311-3 e 96/0618-7).