



Universidade de São Paulo - USP
Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA
Análise de Solo e Planta – CEN 0409



PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

Professores: **Cassio Hamilton Abreu Junior** – cahabreu@cena.usp.br
Takashi Muraoka – muraoka@cena.usp.br

Estagiária PAE: **Dalila Lopes da Silva**– dalila.ls@usp.br
Supervisor: **Juan Ricardo Rocha**– jr.rocha@alumni.usp.br

ROTEIRO

Amostra

Preparo da amostra
(lavagem, secagem e moagem)

Digestão
Nitroperclórica

P e S
Espectro-
fotometria

K, Na
Fotometria
de chama

Cu, Fe, Mn,
Zn, Ca, Mg
Absorção
atômica

Multiele-
mentos
LCP

Digestão
sulfórica

N Kjeldahl

Digestão
seca

B e Mo
Espectro-
fotometria

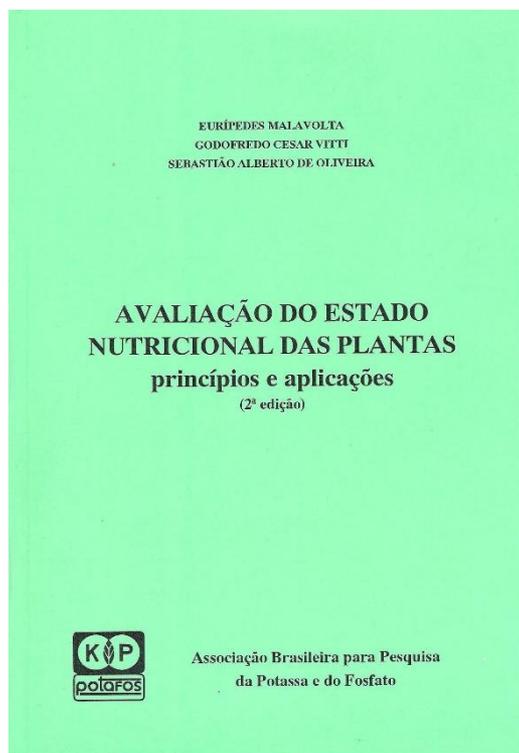
PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Bibliografias recomendadas

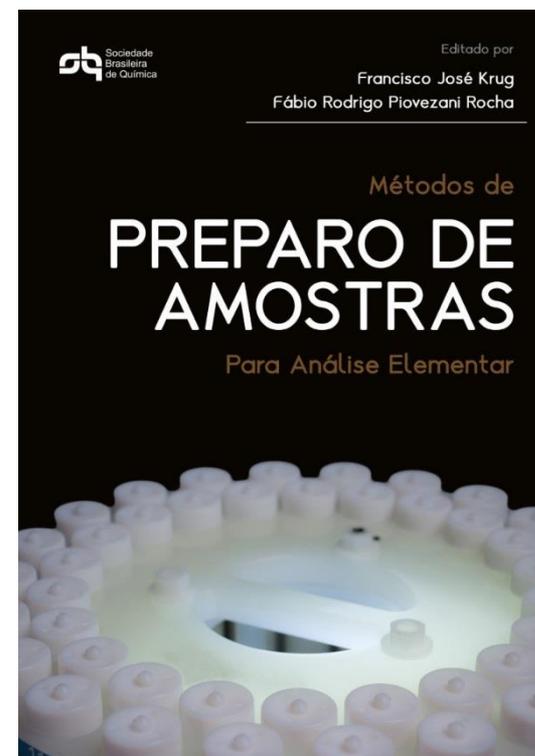
631.41 S546m2 e.1 12438
Biblioteca: CENA e ESALQ



581.13 M239a e.3 10221
Bibliotecas: CENA e ESALQ



543.05 K94m e.1 12606
Biblioteca: CENA



POR QUE?

❑ Determinação da concentração de um elemento em uma amostra particular de uma planta, em um estágio de desenvolvimento morfológico definido (Lucena, 1997).

❑ **Utilizações:**

- ✓ Avaliar estado nutricional X Resposta a adubação
- ✓ Verificar equilíbrio nutricional
- ✓ Deficiência X Toxidez
- ✓ Cultivos hidropônicos e áreas irrigadas (Salinidade)
- ✓ Ajuste do programa de adubação.

➤ Preparo da amostra

- ✓ **Lavagem** → As folhas são lavadas com água de torneira e enxaguadas com água destilada.
- ✓ **Não utilizar folhas secas, murchas ou deterioradas.**
- ✓ Lavagem prévia com detergente neutro 0,1 % e HCl 3,0 % (v/v)
→ **Tecidos com resíduos de pesticidas ou adubos foliares.**
- ✓ **A lavagem deve ser rápida, não excedendo 2 (3 min. max.) minutos de contato entre as folhas e as soluções descontaminantes.**

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Preparo da amostra

✓ Armazenamento e secagem:

A secagem é necessária para interromper as reações enzimáticas responsáveis pelos processos de decomposição e para retirar a água do material vegetal.



PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Preparo da amostra

✓ Armazenamento e secagem:

Moinho de facas de aço inoxidável- Limpeza do moinho entre uma amostra e outra



Sacos de papel



Estufa de circulação forçada de ar até peso constante 60 °C (~ 72 h)



Moinho do tipo Wiley⁷

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Preparo da amostra

✓ Armazenamento e secagem:



Sacos de papel



Estufa de circulação forçada de ar
até peso constante 60 °C (~ 72 h)



Moinho do tipo
Wiley



Peneira com malha de
1,0 mm (20 mesh)



Armazenar em
frasco de vidro

➤ Extração de elementos químicos do tecido vegetal

1. Digestão por via seca

2. Digestão por via úmida

2.1. Digestão úmida com $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1)

2.2. Digestão úmida com $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Kjeldahl)

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

➤ Extração de elementos químicos do tecido vegetal

Características de um reagente ideal:

- ✓ Apresentar capacidade de dissolução de todos os constituintes químicos do tecido vegetal;
- ✓ Não ser agressivo, não corrosivo e não aderente à superfície dos materiais;
- ✓ **Oferecer processo simples**, rápido e com o mínimo de etapas analíticas;
- ✓ Ser de **fácil aquisição** no mercado, **fácil purificação e baixo custo**;
- ✓ Ser de **fácil manuseio**, **não tóxico** e **não poluente** (sem produção de gases ou vapores tóxicos)

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Extração de elementos químicos do tecido vegetal

Reagentes comumente utilizados:

HNO_3 → Ácido Nítrico

NaOH → Hidróxido de Sódio

HClO_4 → Ácido Perclórico

H_2SO_4 → Ácido Sulfúrico

H_2O_2 → Peróxido de Hidrogênio

K_2SO_4 → Sulfato de Potássio

CuSO_4 → Sulfato de Cobre

Nenhum reagente atende a todas exigências!



1. Digestão por via seca (incineração)

- ✓ É uma das técnicas mais antigas e simples de análise do tecido vegetal

Princípio: A matéria orgânica do tecido vegetal é incinerada em mufla elétrica sob temperatura de 450 a 550 °C e o resíduo orgânico é dissolvido em solução de ácido diluído.

Elementos: Al, B, Ca, Cd, Cl, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si e Zn

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

1. Digestão por via seca (incineração)

✓ **Material:**



Mufla elétrica com controle de temperatura



Cadinho de porcelana de 100 mL

✓ **Reagentes:** HNO_3 (1,0 N ou $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH 10 % em H_2O (m/v)



+



PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

1. Digestão por via seca (incineração)

✓ Procedimento:



500 mg



Cadinho de porcelana



Mufla elétrica

500 °C por 3 h



- Al, B, Ca, Cd, Cl, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Se e Zn → **25 mL de HNO₃ 1,0 mol L⁻¹**
- Si por espectrofotometria → transferir a cinza para um frasco de polietileno de 50 mL e adicionar **5,0 mL de NaOH 10 %**

1. Digestão por via seca (incineração)

Vantagens:

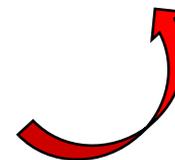
- ✓ Simplicidade e execução;
- ✓ Determinação de vários elementos;
- ✓ Não poluição do ambiente do laboratório com gases.

Desvantagens:

- ✓ Lento (mais de 24 h);
- ✓ Trabalhoso (filtração);
- ✓ Difícil automação;
- ✓ Há possibilidade de perdas por volatilização;
- ✓ Mais sujeito à contaminação externa.

Haletos de Pb, Cd e Na \rightarrow H_2SO_4

Haletos de Cl, P e B \rightarrow NaOH ou CaO

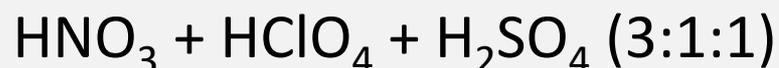
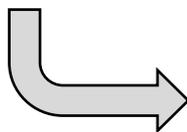


2. Digestão por via úmida

Princípio: A matéria orgânica do tecido vegetal é oxidada com ácidos minerais concentrados e a quente.

Ácidos utilizados: HCl, HNO₃, HClO₄, H₂SO₄.

Misturas



2. Digestão por via úmida

❑ Mistura de HNO_3 + HClO_4 (3:1)

- ✓ A mais utilizada para digestão de tecidos vegetais (folhas, sementes, raízes, caules, cascas...)
- ✓ **Elementos:** Al, B, Ca, Cd, Cl, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Se, Si e Zn

Observação:

Sementes com alto teor de óleo → pré-digestão com HNO_3 + H_2O_2 (explosão com perclorato (ClO_4^-) na presença de carbono).

2. Digestão por via úmida

Mistura de $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (3:1:1)

- ✓ Adequada para plantas que contenham altos teores de cinzas (madeira, palha de arroz...).
- ✓ Os elementos **Ca**, **S** e **Cl** não podem ser determinados
 - Ca**: precipita como CaSO_4
 - S**: componente do H_2SO_4
 - Cl**: Cl^- perde-se por evaporação durante a digestão



PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

➤ Extração de elementos químicos do tecido vegetal

Vantagens da amostra líquida:

- ✓ Facilidade no preparo de curvas analíticas com soluções padrão;
- ✓ Maior precisão;
- ✓ Diluição facilitada;
- ✓ Permissão de análise em fluxo;
- ✓ Possibilidade de separar os analitos dos interferentes;
- ✓ Maior velocidade analítica



2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Princípio: O tecido vegetal é digerido com HNO_3 65 % em vaso de Teflon fechado sob temperatura de 170-180 °C e pressão de 20-25 bar.

Fonte de energia: onda de rádio 2.450 MHz, potência de 600-1.000 W.

2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Material → Forno de micro-ondas com controle de temperatura;
Vaso de Teflon (rotor)

Reagente → HNO_3 65 % p.a.

Procedimento → Transferir 500 mg da amostra para vaso de Teflon de 100 mL, adicionar 5,0 mL de HNO_3 65 % p.a e colocá-lo no cilindro de aço de segurança (depende do tipo de rotor).

2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Procedimento → Introduzir o rotor no forno de micro-ondas, aquecer a 170 °C por 10 min (rampa de aquecimento), esfriar e completar o volume até 25 mL com água deionizada.

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas



Rotor de Altíssima Pressão SK-15

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Sequencia da Digestão

O diagrama explica o funcionamento da Sequência de Digestão



2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Vantagens:

- ✓ Determinação de todos os elementos citados em $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ sem perdas de analito por volatilização;
- ✓ Menor tempo de digestão;
- ✓ Menor consumo de HNO_3 ;
- ✓ Mínimo de contaminação externa;
- ✓ Não há desprendimento de gases e vapores tóxicos.

2. Digestão por via úmida

2.3. Digestão úmida em forno de micro-ondas

Desvantagens:

- ✓ Dificuldade de análise em série;
- ✓ Número reduzido de amostras por cada fornada (4-10 amostras);
- ✓ Custo elevado do forno de micro-ondas e dos vasos de Teflon.

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida

2.1. Mistura de $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1)

✓ Material:



- Bloco digestor para 40 tubos
- Tubos digestores de 80 mL



- Placa aquecedora
- Erlenmeyers de 125 mL

✓ Reagentes: $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$

Misturar 600 mL de HNO_3 65 % p.a. e 200 mL de HClO_4 72 % p.a.

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida

2.1. Mistura de HNO_3 + HClO_4 (3:1)

✓ Procedimento:

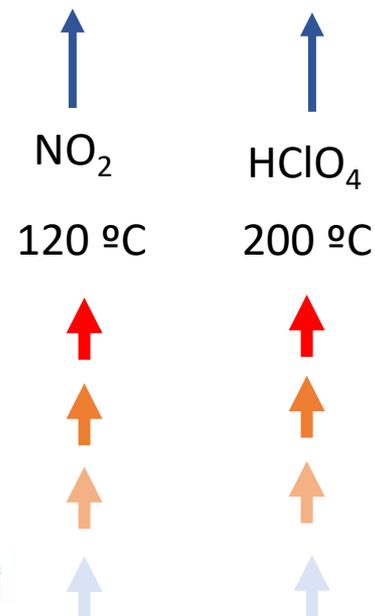


500 mg

Adicionar 8 mL da
mistura digestora



Deixar em pré-digestão
por 12 h (capela)



- Esfriar e completar o volume até 25 mL com água deionizada

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida



120 °C Vapor castanho



200 °C Vapor branco denso

2. Digestão por via úmida

2.1. Mistura de $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1)

✓ Elementos:

Al, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, S, e Zn

✓ Determinação de K: é necessária maior diluição para prevenir possível formação de precipitado KClO_4

✓ Para determinar apenas macronutrientes: diluir em 100 mL com água.

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

2. Digestão por via úmida

2.2. Mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Kjeldahl)

✓ Material:



- Bloco digestor para 40 tubos
- Tubos digestores de 100 mL
- Balão de Kjeldahl de 100 mL

✓ **Reagentes:** H_2SO_4 (98 % p.a.); H_2O_2 (30 % p.a.); Mistura de sais $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$ (10:1)

Obs → Pode-se utilizar Hg, HgO ou Se como catalisador da oxidação da matéria orgânica. Entretanto recomenda-se substituir por Cu^{2+} e H_2O_2 , por serem menos tóxicos!

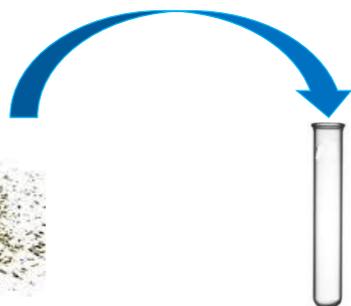
2. Digestão por via úmida

2.2. Mistura de $H_2SO_4 + H_2O_2$ (Kjeldahl)

✓ Procedimento:



100 mg



Adicionar 1,0 g da mistura de sais, 3,0 mL de H_2SO_4 e 1,0 mL de H_2O_2



Manter a 350 °C até obtenção de um líquido viscoso esverdeado

350 °C



- Esfriar e completar o volume até 50 mL com água desionizada

4. Determinação de nitrogênio

❑ Extração (Digestão Sulfúrica – H_2SO_4 e sais catalisadores)

MISTURA DIGESTORA: Em béquer com capacidade para 1.000 mL adicionar, na seguinte ordem: 175 mL de água destilada; 3,60 g de selenito de sódio (Na_2SeO_3); 21,93 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4); 4,0 g de sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 200 mL de (H_2SO_4) **conc.** Misturar muito bem os quatro primeiros reativos para depois acrescentar cuidadosamente o ácido sulfúrico. Completar o volume para 1.000 mL em balão volumétrico.

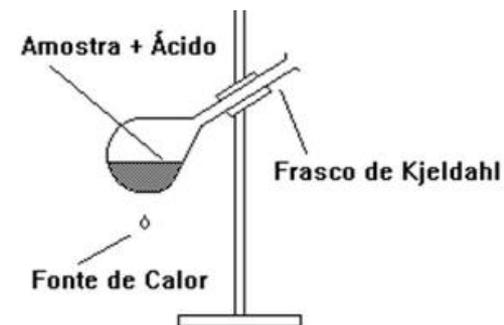
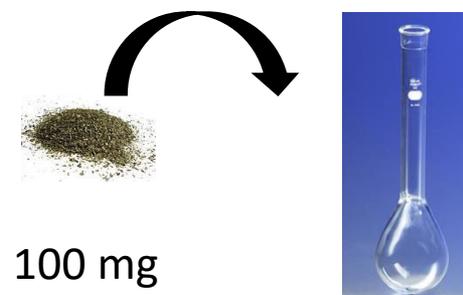
FUNÇÃO DOS REATIVOS: O H_2SO_4 em presença de **agentes catalisadores** ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e Na_2SeO_3) e de sais usados **com a finalidade de elevar o ponto de ebulição do ácido**, como o Na_2SO_4 , irá oxidar a matéria orgânica, transformando o **N** para a forma de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4. Determinação de nitrogênio

❑ Extração (Digestão Sulfúrica – H_2SO_4 e sais catalisadores)

Marcha analítica

- (1) Pesar **100 mg** de amostra vegetal moída para balão de Kjeldahl ou para tubo de digestão;
- (2) Adicionar 10 mL da mistura digestora;
- (3) Levar para microdestilador ou para bloco digestor e submeter à temperatura de **350 °C**, **aumentando 40°C a cada 30 min.** Deixar em 350 °C até completar a digestão, caracterizada pela obtenção de um **líquido incolor ou levemente esverdeado**;
- (4) Guardar o extrato para posterior determinação do teor de N →



EXTRATO 1

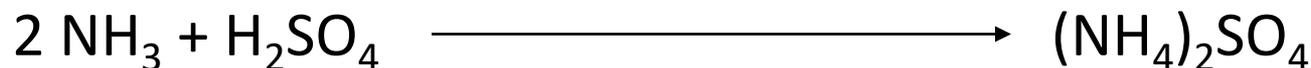
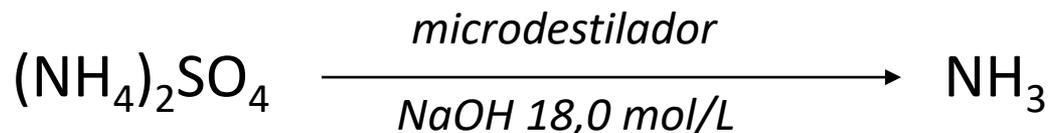
4. Determinação de nitrogênio

Semi-microdestilador Kjeldahl



4. Determinação de nitrogênio

Princípio → Transformação do N-amoniaco [(NH₄)₂SO₄] em amônia (NH₃), que é fixada pelo **ácido bórico** e posteriormente **titulada com H₂SO₄** até nova formação de (NH₄)₂SO₄ na presença de indicador ácido-base.



Reagentes → Solução de NaOH 18 mol L⁻¹; Solução de H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹; Solução de H₃BO₃ com os indicadores verde de bromocresol (15 mL L⁻¹) e vermelho de metila (6 mL L⁻¹).

4. Determinação de nitrogênio

Marcha analítica

- (1) Transferir para o microdestilador o **Extrato 1**, usando pequenas porções de água destilada;
- (2) Começar o aquecimento da água do microdestilador;
- (3) Colocar 10 mL da solução de ácido bórico com indicador em erlenmeyer de 50 mL e fazer com que a saída do microdestilador mergulhe na solução;
- (4) Guardar o copo de entrada do microdestilador aos volumes de 10 e 15 mL;
- (5) Fechar a torneira superior e medir, diretamente no copo de entrada do aparelho, 10 a 15 mL de NaOH 18 mol L⁻¹. Em seguida, abrir a torneira, lavar rapidamente o copo.

4. Determinação de nitrogênio

Marcha analítica

(6) Fechar ambas as torneiras e elevar a temperatura do microdestilador. Deixar destilando até que o volume da solução de ácido bórico com indicador passe a, aproximadamente, o dobro do volume original;

(7) Titular a amônia destilada com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até que o indicador vire de **verde** para **azul-cinza**. Anotar o volume de ácido gasto.



4. Determinação de nitrogênio

Método Malavolta *et al.* (1997)

▪ Solução titulante

✓ Solução de H_2SO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$)

$H_2SO_4 = 98,08 \text{ g mol}^{-1}$; $d = 1,84 \text{ kg L}^{-1}$; pureza = 99,9 %

$1.840,0 \text{ g} \times 0,99 = 1.821,6 \text{ g L}^{-1} \text{ de } H_2SO_4$

$1,0 \text{ mol de } H_2SO_4$ ----- $98,08 \text{ g}$
x ----- $1.821,6 \text{ g}$

$x = 18,57 \text{ mol L}^{-1} \text{ de } H_2SO_4$

**Solução intermediária de
 H_2SO_4 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$)**

$$c1 \times v1 = c2 \times v2$$

$$18,57 \times v1 = 1,0 \times 1.000$$

$$v1 = 53,85 \text{ mL} \rightarrow 1,0 \text{ L}$$

Solução de H_2SO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$)

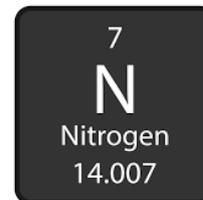
$$c1 \times v1 = c2 \times v2$$

$$1,0 \times v1 = 0,01 \times 1.000$$

$$v1 = 10 \text{ mL} \rightarrow 1,0 \text{ L}$$

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

4. Determinação de nitrogênio



✓ 1,0 mL de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} reage com 0,02 mmol de N

$\text{N} = 14 \text{ g mol}^{-1} \rightarrow 0,02 \text{ mmol de N} = (14 \times 0,02 = 0,28 \text{ mg}) \rightarrow 0,02 \text{ mmol de N} = 0,28 \text{ mg de N}$

Quantidade de material vegetal utilizada na digestão = **100 mg**

➤ Suponhe que o volume de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} gasto na titulação foi de: **10 mL**

<i>1,0 mL de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1}</i>	<i>-----</i>	<i>0,28 mg de N</i>	<i>2,8 mg de N</i>	<i>-----</i>	<i>0,1 g de MS*</i>
<i>10,0 mL de H_2SO_4 0,01 mol L^{-1}</i>	<i>-----</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>-----</i>	<i>1000 g de MS</i>
		<i>x = 2,8 mg de N em 100 mg de amostra</i>			<i>y = 28000 mg kg^{-1} de N</i>

* Matéria Seca

Teor de N = 28 g kg^{-1} de N

5. Determinação do fósforo (P)

Digestão nítrico-perclórica ($\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 - 3:1$)

- (1) Pesar **500 mg** de material vegetal seco e moído e colocar em tubo de digestão ou erlenmeyers;
- (2) Adicionar 6,0 mL de uma mistura de HNO_3 e HClO_4 na **proporção de 3:1**;
- (3) Levar para bloco digestor ou placa aquecedora aumentando gradativamente a temperatura até atingir 160 °C e deixar nessa temperatura até o volume ser reduzido à metade (cerca de 40 min). Aumentar a temperatura para 210 °C e deixar nesta temperatura até se obterem fumos brancos de HClO_4 e o **extrato apresentar-se incolor** (cerca de 20 min).
- (4) Esfriar, transferindo o extrato para balão volumétrico de **50 mL** com água deionizada.

EXTRATO 2

5. Determinação do fósforo (P)

□ Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

Princípio → O método é baseado na formação de um composto amarelo do sistema vanadomolibdofosfórico.



A cor desenvolvida é medida em fotocolorímetro ou espectrofotômetro utilizando-se um filtro de cor complementar à da amostra. Mede-se a porcentagem de transmissão (% T), a absorvância (A) ou a densidade ótica (D.O.)

5. Determinação do fósforo (P)

☐ Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

• *Reagentes*

✓ Solução aquosa de molibdato de amônio a 5 % $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$:

Em béquer de 1.000 mL colocar cerca de 400 mL de água destilada quente. Acrescentar aos poucos e agitando até dissolver, 25,0 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Esperar esfriar e passar para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume.

✓ Solução de metavanadato de amônio a 0,25 % (NH_4VO_3) :

Em béquer de 1.000 mL contendo cerca de 400 mL de água destilada quente, adicionar 1,25 g de (NH_4VO_3) a agitar até dissolver. Acrescentar 175,0 mL de HNO_3 concentrado e esfriar. Passar para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume (**guardar em frasco âmbar**).

5. Determinação do fósforo (P)

Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

- *Reagentes*

- ✓ **Reativo misturado:**

Misturar partes iguais de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (5 %) com (NH_4VO_3) (0,25 %) e guardar em refrigerador.

Obs: deve-se preparar o reativo um pouco antes de utilizá-lo, pois em refrigerador tem a duração aproximada de uma semana. **(preparar quantidade necessária para utilizar no dia)**

5. Determinação do fósforo (P)

Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

- **Reagentes**

- ✓ **Solução-estoque de fósforo (80 mg L⁻¹ de P):**

Em balão volumétrico de 1.000 mL contendo cerca de 300 mL de água destilada e 10,0 mL de H₂SO₄ (5,0 mol L⁻¹), adicionar 0,3509 g de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) seco em estufa por 2 h a 70-80 °C e resfriado em dessecador. Agitar e completar o volume com água destilada.

- ✓ **Soluções padrão de P:**

Em balões volumétricos de 100 mL adicionar, por meio de uma bureta: 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mL da solução-estoque de P (80 mg L⁻¹), 4,0 mL de H₂SO₄ (5,0 mol L⁻¹), completar o volume com água destilada e homogeneizar.

[0,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 mg L⁻¹ de P]

5. Determinação do fósforo (P)

☐ Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

- *Marcha analítica*

- ✓ *Obtenção de curva-padrão*

- 1) Pipetar 5,0 mL dos padrões para tubo de colorímetro;
- 2) Adicionar 2,0 mL do reativo misturado e homogeneizar;
- 3) Deixar em repouso por 5,0 min e ler em colorímetro utilizando filtro azul ($\lambda = 420 \text{ nm}$);
- 4) Fazer a curva padrão de P que relaciona os valores de absorvância (Abs; nm) em função das concentrações de P no extrato ([P]; mg/L)

$$\text{Abs} = f([\text{P}])$$

5. Determinação do fósforo (P)

Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

- *Marcha analítica*
- ✓ *No extrato vegetal*

EXTRATO 2



- 1) Pipetar 1,0 ou 2,0 mL do extrato nítrico-perclórico para tubo de colorímetro;
- 2) Adicionar 4,0 ou 3,0 mL de água destilada; 2,0 mL do reativo colorido e homogeneizar;
- 3) A partir deste ponto fazer os procedimentos como descrito para a curva-padrão;

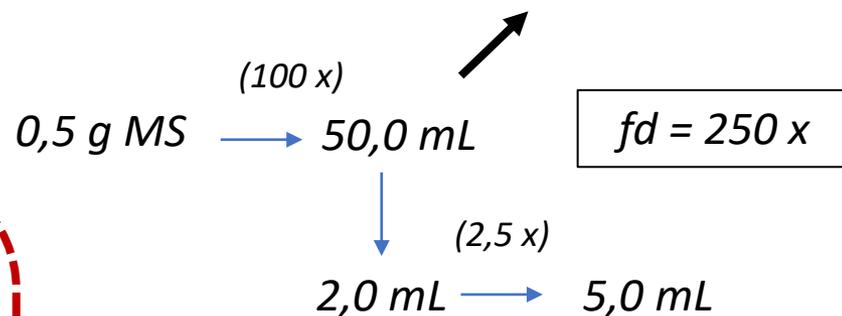
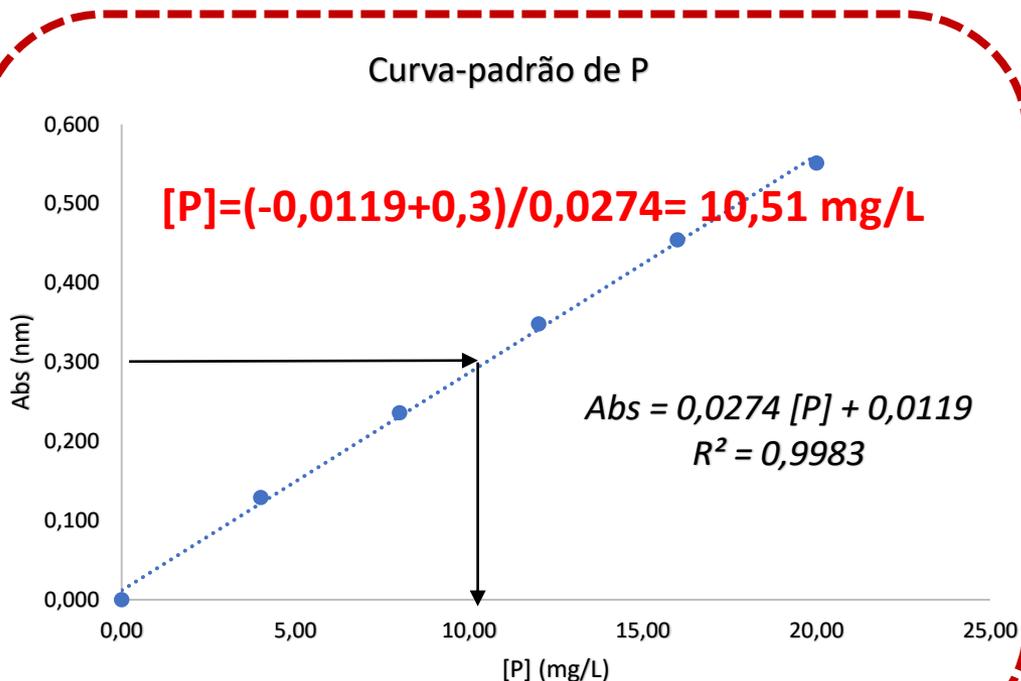
PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

5. Determinação do fósforo (P)

Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

EXTRATO 2

• Cálculo



Leitura de uma amostra $\rightarrow Abs = 0,300$

$[P]$ na solução de leitura = 10,51 mg/L

Teor de P na matéria seca (MS):

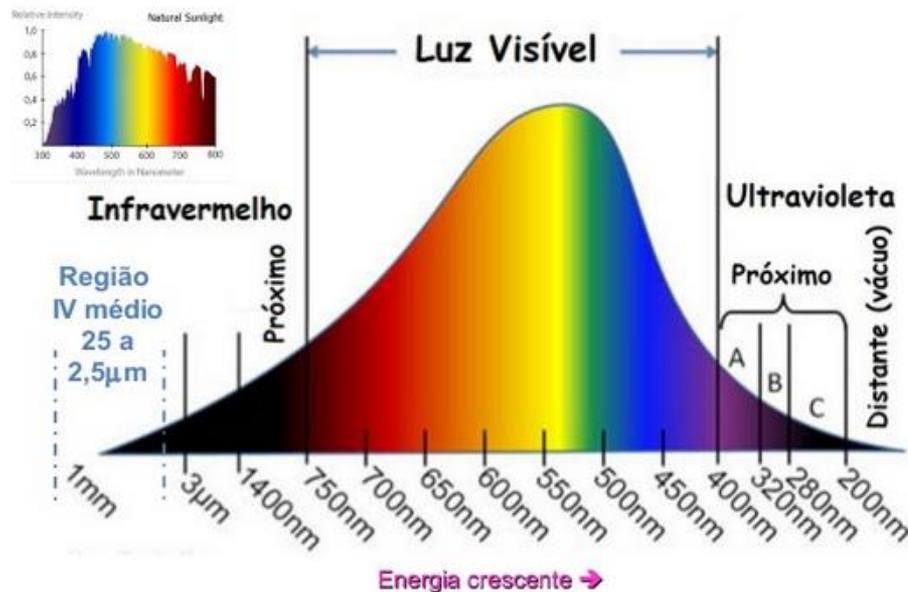
$$10,51 \times 250 = 2627,5 \text{ mg/kg}$$

Teor de P = 2,63 g/kg

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

5. Determinação do fósforo (P)

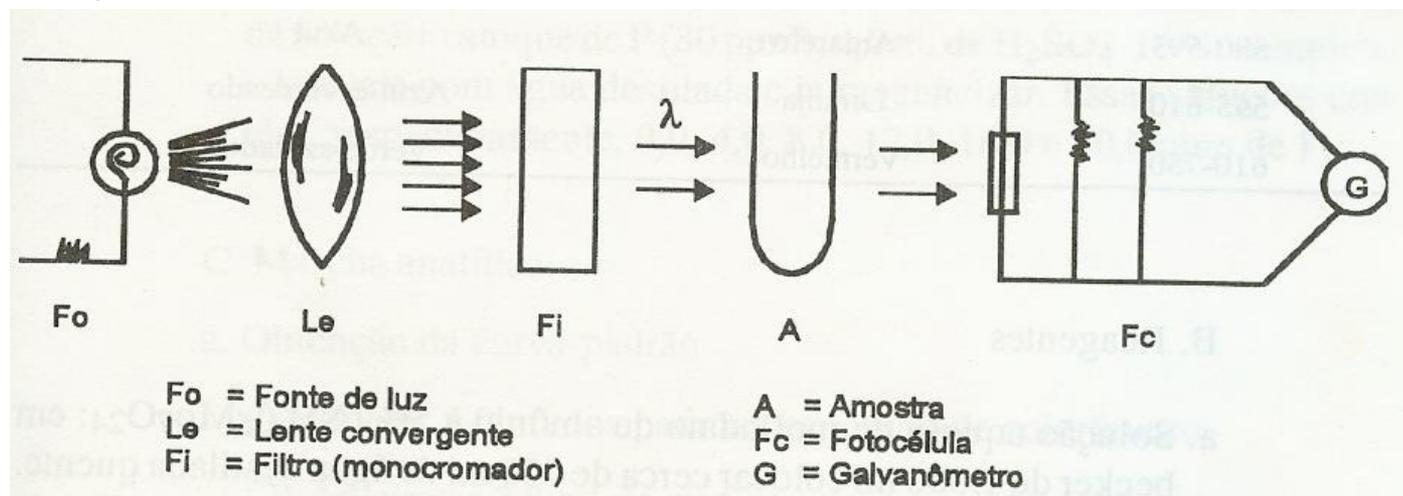
Colorimetria do metavanadato (fósforo total)



5. Determinação do fósforo (P)

Colorimetria do metavanadato (fósforo total)

✓ Esquema simplificado de um fotolorímetro



Número do filtro	Cor do filtro	λ (nm)	Coloração das soluções
42	Azul	400 – 465	vermelho, laranja, amarelo, verde, turbidez
54	Verde	500 – 570	vermelho, púrpura, laranja, azul
66	Vermelho	640 - 700	azul, verde, amarelo

6. Determinação de Enxofre (S)

Turbidimetria do sulfato de bário

- **Princípio** → É baseado na turbidez formada pela precipitação do enxofre pelo cloreto de bário, na forma de sulfato de bário. A turbidez é medida em colorímetro ou espectrofotômetro na forma de transmitância (T) ou absorvância (A).

EXTRATO 2

6. Determinação de Enxofre (S)

Turbidimetria do sulfato de bário

- ***Reagentes***

- ✓ **Solução-estoque de S (1.000 mg L⁻¹ de S):**

Em balão volumétrico de 1.000 mL adicionar 5,434 g de K₂SO₄ p.a. seco em estufa, dissolver e completar o volume com água deionizada.

- ✓ **Soluções-padrão de sulfato (0,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L⁻¹ de S):**

Em balões volumétricos de 100 mL acrescentar, 0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mL da solução estoque de S e completar o volume com água deionizada.

6. Determinação de Enxofre (S)

☐ Turbidimetria do sulfato de bário

- *Reagentes*

- ✓ **Solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ (contendo 20,0 mg L⁻¹ de S):**

Em balão volumétrico de 1.000 mL acrescentar, aproximadamente, 200 mL de água deionizada, em seguida, 500 mL de HCl p.a. e 0,1087 g de K₂SO₄ p.a. Agitar e completar o volume com água deionizada.

- ✓ **Cristais de cloreto de bário (BaCl₂ 2H₂O; 99,0 % de pureza):**

Devem ser utilizados obrigatoriamente cristais de cloreto de bário que passem por peneira de 20 mesh e que fiquem retidos na de 60 mesh.

6. Determinação de Enxofre (S)

Turbidimetria do sulfato de bário

- *Marcha analítica*

- ✓ *Obtenção da curva padrão*

- 1) Em Erlenmeyer de 125 mL, adicionar 10 mL das soluções-padrão de sulfato e fazer prova em branco com 10 mL de água deionizada;
- 2) Adicionar 1,0 mL de solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ contendo 20 mg L⁻¹ de S;
- 3) Juntar cerca de 500 mg de cristais de cloreto de bário às soluções e esperar cerca de 1,0 min sem agitar;
- 4) Agitar durante 30 s, dissolvendo os cristais e ler em até 8 min em $\lambda = 420$ nm.

6. Determinação de Enxofre (S)

☐ Turbidimetria do sulfato de bário

- *Marcha analítica*
- ✓ *Obtenção da curva padrão*

Obs → Neste processo podem ser analisadas até 11 amostras simultaneamente, atingindo um tempo total de cerca de 6,0 min;

5) Montar a curva padrão (assim como demonstrado para o P);

6. Determinação de Enxofre (S)

Turbidimetria do sulfato de bário

- *Marcha analítica*
- ✓ *No extrato vegetal*

EXTRATO 2



- 1) Tomar uma alíquota de 10,0 mL do extrato nítrico-perclórico e transferir para Erlenmeyer de 125 mL;
- 2) Em seguida, proceder como descrito para obtenção da curva-padrão;

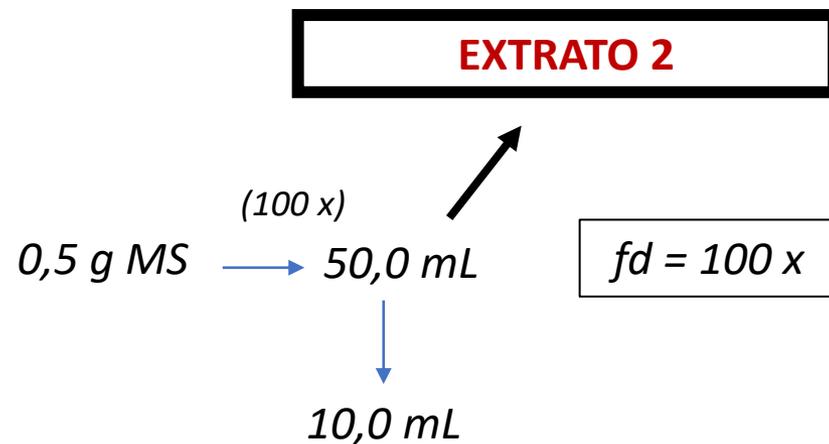
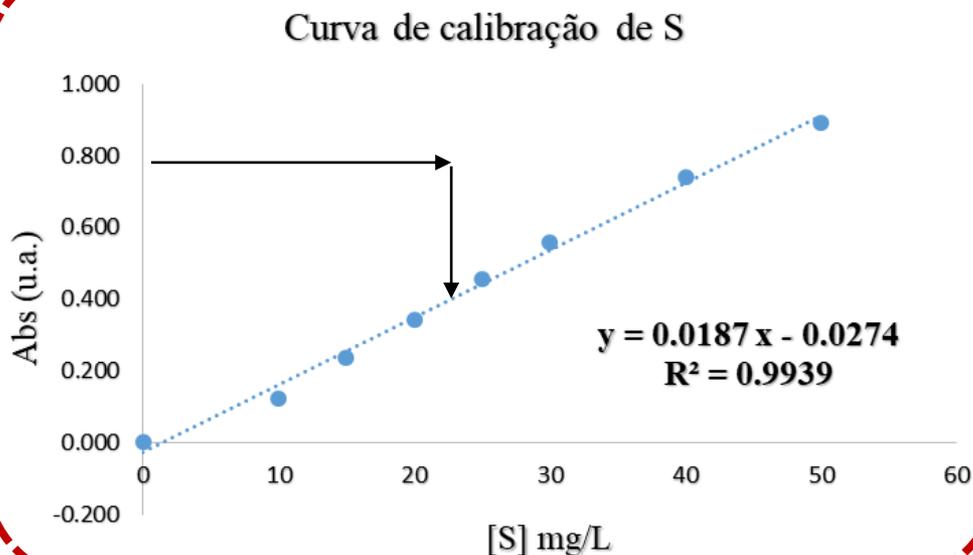
PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

6. Determinação de Enxofre (S)

☐ Turbidimetria do sulfato de bário

• Cálculo

$$[S] = (0,0274 + 0,4) / 0,0187 = 22,8 \text{ mg/L}$$



Leitura de uma amostra \rightarrow Abs = 0,400

[S] na solução de leitura = 22,8 mg/L

Teor de S na matéria seca (MS):

$$22,8 \times 100 = 2200 \text{ mg/kg}$$

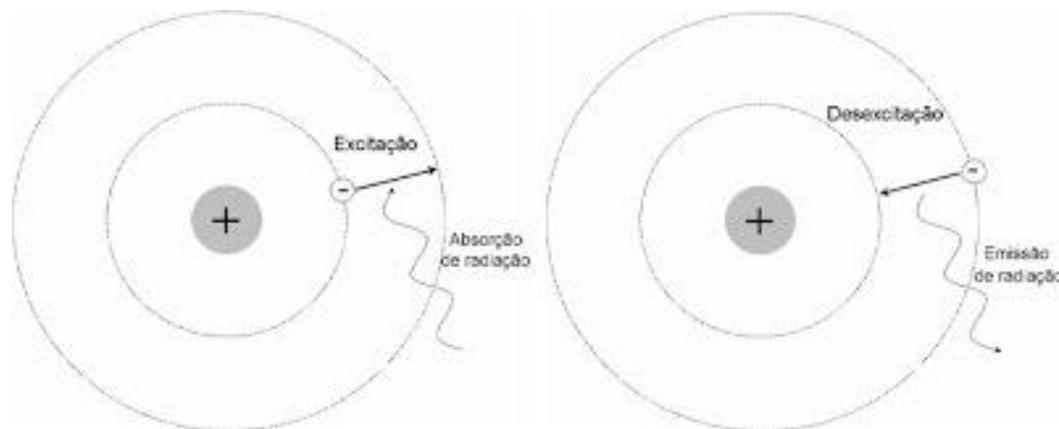
Teor de S = 2,2 g/kg

7. Determinação de Potássio (K)

☐ Fotometria de chama de emissão →

EXTRATO 2

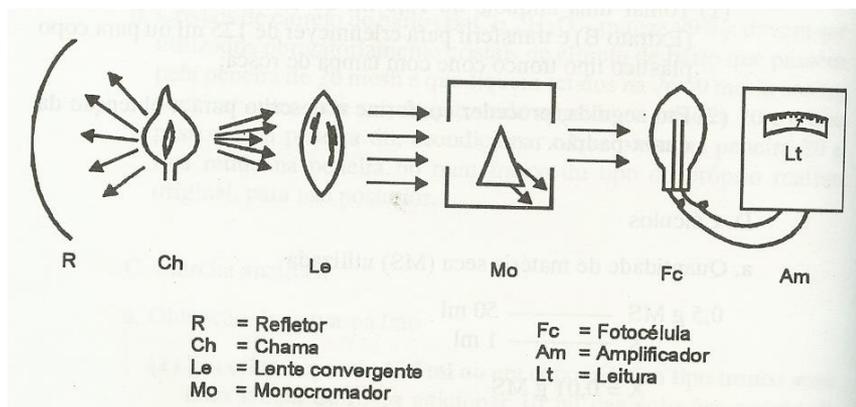
- **Princípio** → A solução contendo os elementos é atomizada e suas partículas são dirigidas à chama, onde ocorre excitação dos elétrons dos átomos para níveis energéticos mais elevados. Ao voltar ao estado normal há emissão da energia absorvida na forma de radiação. A intensidade das radiações emitidas, num determinado comprimento de onda é relacionada com o a concentração dos elementos



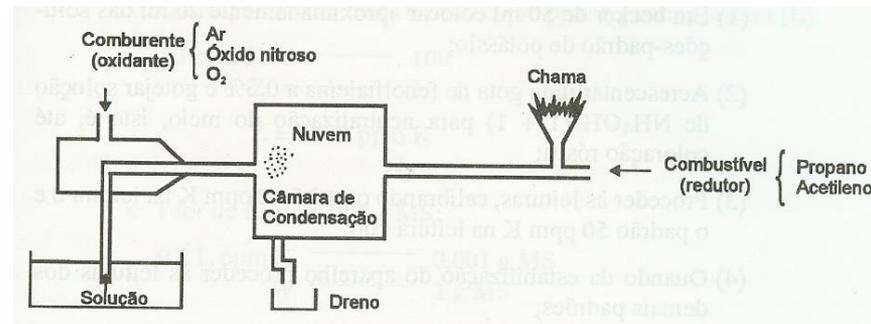
PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

7. Determinação de Potássio (K)

☐ Fotometria de chama de emissão



Esquema simplificado de um fotômetro de chama



Queimador de um fotômetro de chama

7. Determinação de Potássio (K)

Fotometria de chama de emissão

- *Reagentes*

- ✓ **Solução-estoque de K (1.000 mg L⁻¹ de K):**

Dissolver 1,907 g de KCl p.a., seco previamente em estufa a 100°C por 2 h, em água destilada, completar o volume para 1.000 mL;

- ✓ **Solução-padrão de K :**

Em balões volumétricos de 100 mL, pipetar 0,8 mL de ácido perclórico HClO₄ e 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mL da solução-estoque (1.000 mg L⁻¹ de K), completando o volume com água destilada. Essas soluções contêm 0,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 mg L⁻¹ de K;

7. Determinação de Potássio (K)

Fotometria de chama de emissão

- *Reagentes*

- ✓ **Solução de fenolftaleína (5 %):**

- Pesar 0,5 g de fenolftaleína e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com álcool etílico;

- ✓ **Solução de hidróxido de amônio (NH₄OH 1 + 1):**

- Misturar partes iguais de hidróxido de amônio NH₄OH concentrado e de água destilada;

7. Determinação de Potássio (K)

☐ Fotometria de chama de emissão

- *Marcha analítica*

- ✓ *Obtenção da curva-padrão*

- 1) Em Becker de 50 mL colocar, aproximadamente, 20 mL das soluções-padrão de K;
- 2) Acrescentar uma gota de fenolftaleína a 0,5 % e gotejar a solução de NH_4OH (1 + 1) para neutralização do meio, até a coloração rósea;
- 3) Proceder às leituras ($\lambda = 766,5 \text{ nm}$), **calibrando o padrão $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de K na leitura de 0 % e o padrão de 50 mg/L de K na leitura 100 % ;**
- 4) Fazer as leituras dos demais pontos da curva-padrão.

7. Determinação de Potássio (K)

☐ Fotometria de chama de emissão

- *Marcha analítica*
✓ *No extrato vegetal*

EXTRATO 2



1) Diluir no extrato nítrico-perclórico na proporção 1 + 9 , usando uma parte de solução para nove partes de água destilada contendo 4,0 mL de $\text{HClO}_4 \text{ L}^{-1}$;

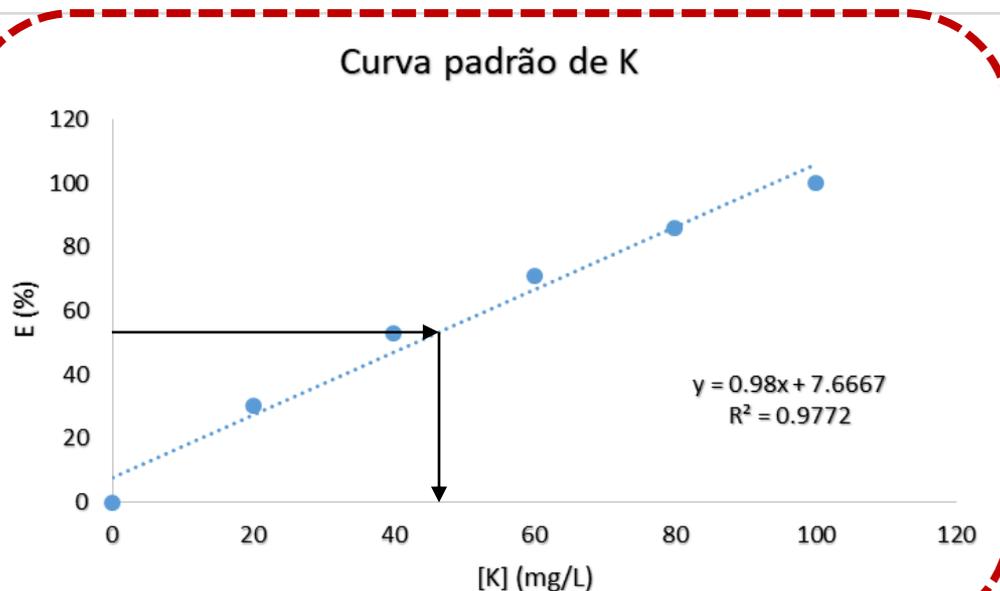
2) Neutralizar o extrato e proceder à leitura no fotômetro, conforme realizado para os pontos da curva-padrão;

7. Determinação de Potássio (K)

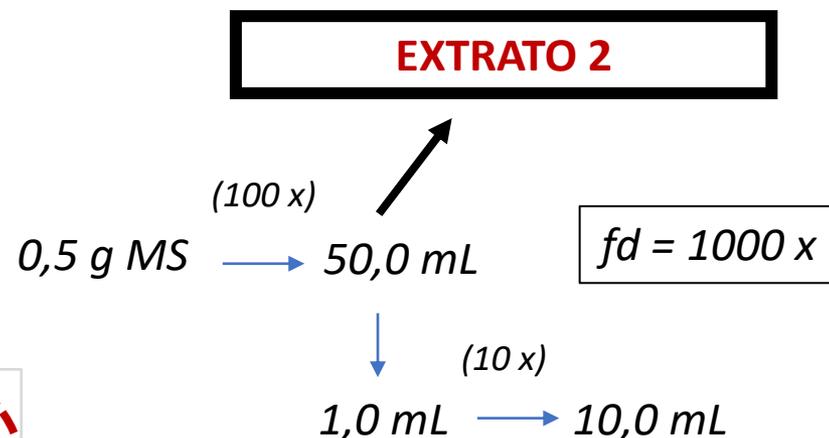
Fotometria de chama de emissão

- Cálculo**

$$[K] = (-7,6667 + 55) / 0,98 = 48,29 \text{ mg/L}$$



E = Emissão (%)



Leitura de uma amostra $\rightarrow E = 55 \%$

[K] na solução de leitura = 48,29 mg/L

Teor de K na matéria seca (MS):
 $48,29 \times 1000 = 48299,28 \text{ mg/kg}$

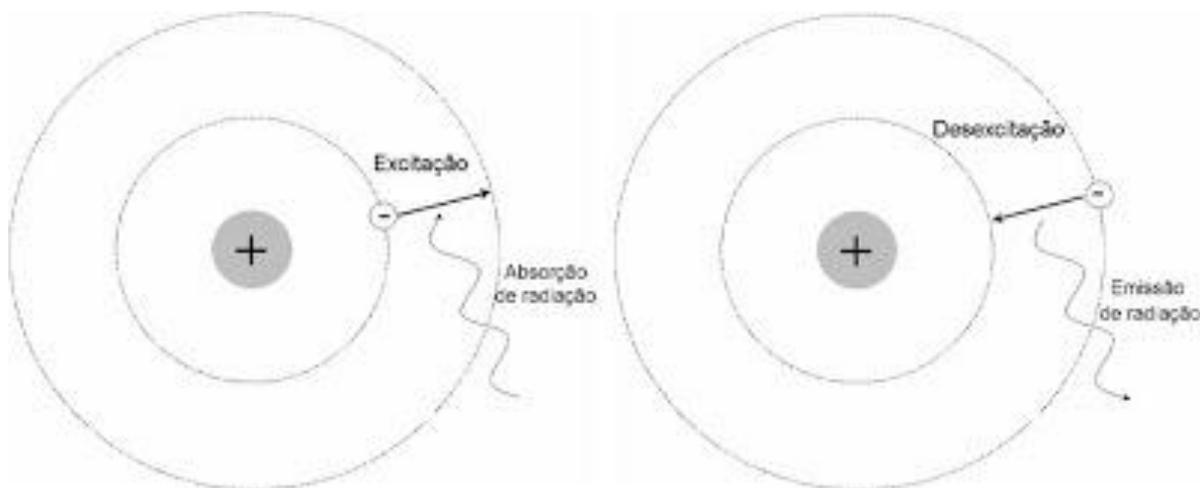
Teor de K = 48,29 g/kg

8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

Espectrofotometria de absorção atômica →

EXTRATO 2

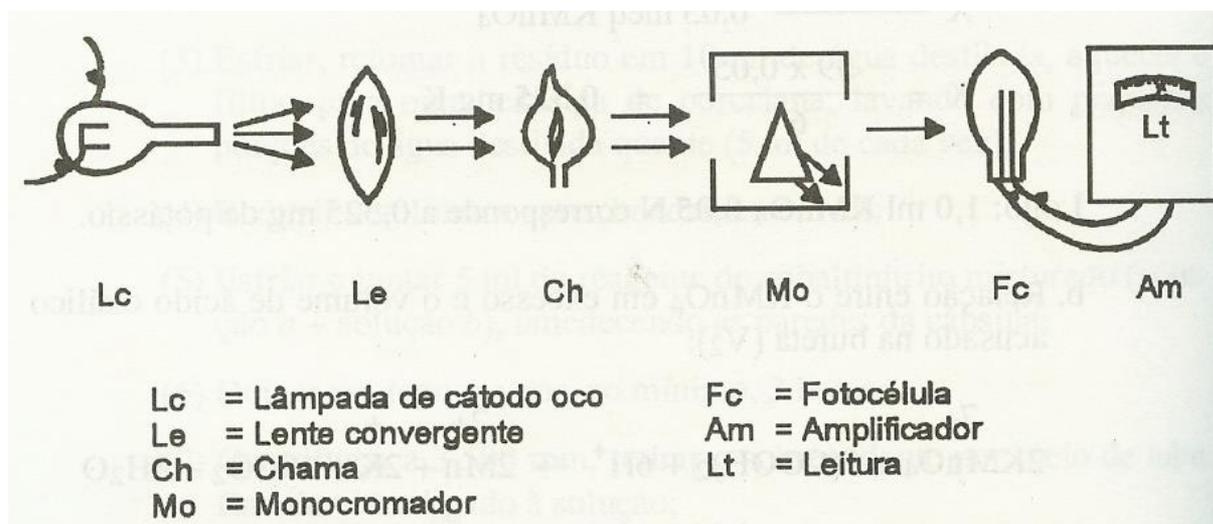
- **Princípio** → absorção atômica é a medida da intensidade da radiação absorvida por átomos de um elemento no estado fundamental em altas temperaturas, no comprimento de onda da linha de ressonância (Walsh, 1955).



8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

Espectrofotometria de absorção atômica

Obs → São utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca-Mg ou individuais de Ca e Mg, sendo necessária a adição de lantânio ou estrôncio para prevenir interferências ocasionadas pela presença de fosfatos de alumínio.



8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

Espectrofotometria de absorção atômica



8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

Espectrofotometria de absorção atômica

- ***Reagentes***

- ✓ **Solução-estoque de Ca e de Mg:**

Preparar solução-estoque de 500 mg L⁻¹ de Ca, utilizando CaCO₃ e 100 mg L⁻¹ de Mg utilizando MgSO₄ 7H₂O.

- ✓ **Solução de lantânio a 5 % ou de estrôncio a 5 %:**

Em balão volumétrico de 1.000 mL acrescentar cerca de 250 mL de água deionizada, 58,5 g de La₂O₃ ou 76,07 g de SrCl₂.6H₂O, 125 ml de HCl conc. E completar o volume para 1.000 mL com água deionizada.

8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

Espectrofotometria de absorção atômica

- *Marcha analítica*

EXTRATO 2



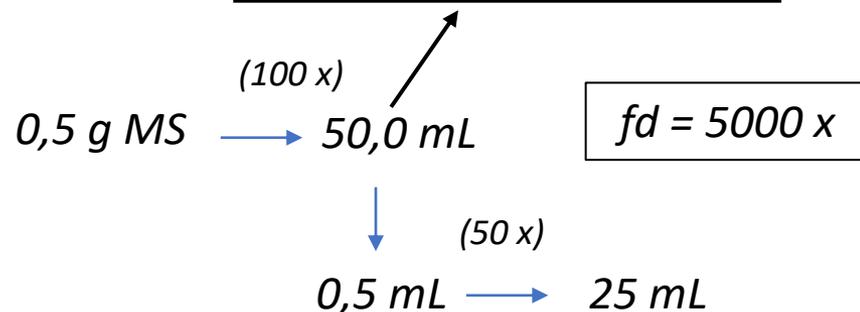
1) Proceder às leituras das soluções-padrão ou do extrato nítrico-perclórico, transferindo 0,5 mL do extrato para copo plástico, acrescentando 22,0 mL de água deionizada 2,5 mL da solução de La ou de Sr a 5 % e homogeneizando.

8. Determinação de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

☐ Espectrofotometria de absorção atômica

• *Cálculo*

EXTRATO 2



Leitura de uma amostra \rightarrow Abs = 0,195 nm

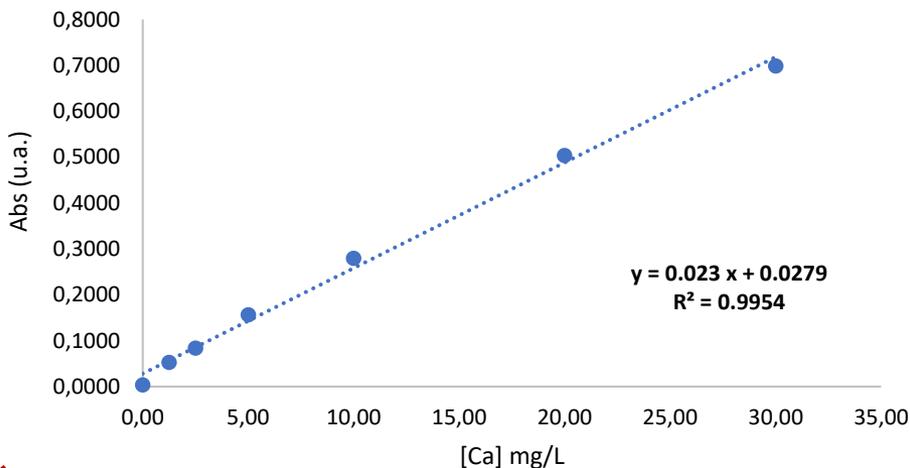
[Ca] na solução de leitura = X mg/L

Teor de Ca na matéria seca (MS):

$$X \times 5000 = Y \text{ mg/kg}$$

$$\text{Teor de Ca} = (Y/1000) \text{ g/kg}$$

Curva de calibração de Ca



9. Determinação do Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn)

Espectrofotometria de absorção atômica

- ✓ Os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn podem ser determinados diretamente em extrato nítrico-perclórico por espectrofotometria de absorção atômica, sem praticamente, haver problemas de interferência ou de ionização, utilizando as lâmpadas de cátodo oco respectivas.
- ✓ Assim como demonstrado para Ca e Mg, deve-se ter uma solução-padrão de cada elemento para construir a curva de calibração e proceder os cálculos do teor do elemento no tecido vegetal a partir da leitura de absorbância.
- ✓ A expressão dos resultados para os micronutrientes deve ser em **mg/kg**

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

9. Determinação do Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn)

Espectrofotometria de absorção atômica

Tabela 6-5. Soluções-padrão múltiplas de cobre, manganês e zinco.

Balão 100 ml (nº)	Soluções-estoque (100 ppm)			Soluções-padrão de uso		
	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn
	----- (ml) -----			----- (ppm) -----		
0	0	0	0	0	0	0
1	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5
2	0,6	1,0	1,0	0,6	1,0	1,0
3	0,8	2,0	1,5	0,8	2,0	1,5
4	1,0	5,0	2,0	1,0	5,0	2,0
5	1,5	10,0	2,5	1,5	10,0	2,5
6	2,0	15,0	3,0	2,0	15,0	3,0

PREPARO, DIGESTÃO E ANÁLISE QUÍMICA DO TECIDO VEGETAL

9. Determinação do Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn)

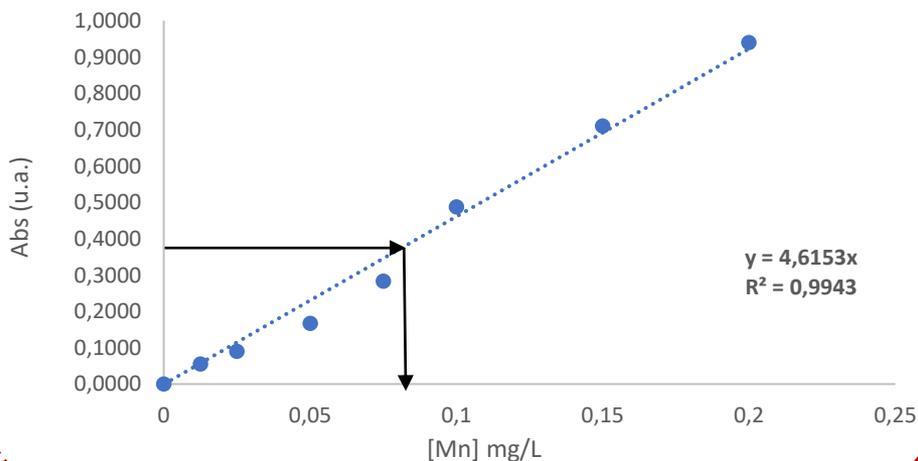
Espectrofotometria de absorção atômica

- Cálculo**

EXTRATO 2

0,5 g MS $\xrightarrow{(100 \times)}$ 50,0 mL \uparrow $fd = 100 \times$

Curva de calibração do Mn



Leitura de uma amostra \rightarrow Abs = 0,37 nm

[Mn] na solução de leitura = 0,08 mg/L

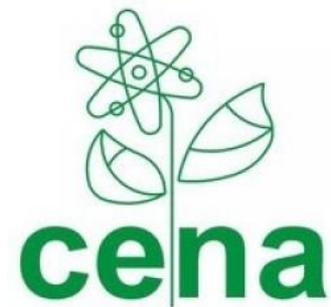
Teor de Mn na matéria seca (MS):

$$0,08 \times 100 = 8 \text{ mg/kg}$$

Teor de Mn = 8 mg/kg



Universidade de São Paulo - USP
Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA
Análise de Solo e Planta – CEN 0409



Obrigado!

Perguntas?

Professores: **Cassio Hamilton Abreu Junior** – cahabreu@cena.usp.br
Takashi Muraoka – muraoka@cena.usp.br

Estagiária PAE: **Dalila Lopes da Silva**– dalila.ls@usp.br
Supervisor: **Juan Ricardo Rocha**– jr.rocha@alumni.usp.br