

ISSN 0100-8986

Documentos N.º 242

Métodos de análise foliar utilizados no Laboratório de Ensaio Químico da Epagri/EECd

Bianca Schweitzer
Atsuo Suzuki



Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
Florianópolis
2013

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri)
Rodovia Admar Gonzaga, 1.347, Itacorubi, Caixa Postal 502
88034-901 Florianópolis, SC, Brasil
Fone: (48) 3665-5000, fax: (48) 3665-5010
Site: www.epagri.sc.gov.br

Editado pela Epagri/Gerência de Marketing e Comunicação (GMC).

Revisão: Abel Viana
Arte-final: Zélia Alves Silvestrini
Capa: Vilton Jorge de Souza

Assessoria técnico-científica:
Evandro Spagnollo - Epagri/Cepaf
Francisco Carlos Deschamps - Epagri/E. E. Itajaí
Milton da Veiga - Epagri/E. E. Campos Novos

Tiragem: 600 exemplares
Impressão: Dioesc

É permitida a reprodução parcial deste trabalho desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

SCHVEITZER, B.; SUZUKI, A. **Métodos de análise foliar utilizados no Laboratório de Ensaio Químico da Epagri/EECd**. Florianópolis: Epagri, 2013. 30p. (Epagri. Documentos, 242).

Análise foliar; Laboratório; Caçador; Santa Catarina.

ISSN 0100-8986

AUTORES

Bianca Schweitzer é Mestre em Química, responsável pelo Laboratório de Ensaio da Epagri/Estação Experimental de Caçador, localizada na Rua Abílio Franco, 1500 - Caixa Postal 591, 89500-000 Caçador, SC. Contatos pelo telefone (49) 3561-2034 e pelo e-mail: biancaschweitzer@epagri.sc.gov.br.

Atsuo Suzuki é engenheiro-agrônomo, Mestre em Solos e Nutrição de Plantas e pesquisador da Epagri/Estação Experimental de Caçador. Contatos pelo telefone (49) 3561-2006 e pelo e-mail: suzuki@epagri.sc.gov.br.

APRESENTAÇÃO

A análise foliar é uma importante ferramenta de avaliação do estado nutricional das plantas, pois permite verificar se os nutrientes existentes no solo mais os aplicados através de fertilizantes supriram as necessidades da planta e se existe deficiência ou toxidez de algum deles. A análise foliar permite o diagnóstico rápido da necessidade de suplementação dos nutrientes, principalmente os micronutrientes, uma vez que a avaliação das condições da planta e a definição de adubação desses elementos não podem ser detectadas apenas pela análise do solo.

Neste trabalho são abordados os temas desde a amostragem, pois o diagnóstico correto do estado nutricional e a confiabilidade nos resultados dependem diretamente da correta amostragem das folhas. Para isso, é necessário que se procedam a coleta e o preparo das amostras seguindo as recomendações específicas para cada cultura. Isso se deve ao fato de que as tabelas de interpretação foram formuladas com base em material localizado em partes específicas da planta e coletado em período pré-estabelecido, quando as folhas a serem amostradas atingiram maturação fisiológica, estando menos sujeitas a variações no teor de nutrientes. Estão também apresentados neste trabalho todas as metodologias empregadas para a determinação dos teores minerais, macro e micronutrientes, presentes nas folhas.

Este é mais um serviço, prestado pela Epagri, para o desenvolvimento da agricultura catarinense.

A Diretoria Executiva

SUMÁRIO

Introdução	7
1 Estrutura do Laboratório de Ensaio Químico	9
2 Amostragem	10
2.1 Cuidados especiais na coleta de folhas	10
2.2 Como coletar as amostras de folhas	10
2.3 Amostragens de material fora do período recomendado ou sem padrão de interpretação dos resultados	13
3 Recepção das amostras	13
4 Limpeza das vidrarias	14
5 Preparo das amostras	15
5.1 Secagem	15
5.2 Moagem	15
6 Solubilização das amostras (digestão)	15
6.1 Solubilização via seca para determinação de Boro (B)	16
6.1.1 Materiais e equipamentos	16
6.1.2 Reagentes	16
6.1.3 Soluções	16
6.1.4 Procedimento analítico	17
6.1.5 Cálculo	21
6.2 Solubilização sulfúrica para determinação de Nitrogênio (N)	19

6.2.1 Materiais e equipamentos	19
6.2.2 Reagentes	19
6.2.3 Soluções	20
6.2.4 Procedimento analítico	20
6.2.5 Cálculo	21
6.3 Solubilização nitro-perclórica para determinação de macro (P, Mg, Ca, K) e micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu)	22
6.3.1 Materiais e equipamentos	23
6.3.2 Reagentes	23
6.3.3 Soluções	23
6.3.4 Procedimento analítico	25
6.3.5 Determinação das concentrações de Cu, Fe, Zn, Mn, Ca, K e Mg	25
6.3.6 Espectrometria UV-VIS com determinação colorimétrica pelo método de amarelo de vanadato – molibdato de amônia para a determinação da concentração de P	27

Introdução

A análise química de folhas, ou análise foliar, é uma importante ferramenta de avaliação do estado nutricional das plantas, ou seja, permite verificar se os nutrientes existentes no solo mais os aplicados através de fertilizantes supriram as necessidades da planta e se existe deficiência ou toxidez de algum deles. Os resultados da análise auxiliam os produtores rurais nos ajustes em programas de adubação, objetivando atingir maior produtividade e economia, sempre respeitando o meio ambiente (Basso & Dal Bó, 1988; Suzuki & Basso, 2002; Carmo et al., 2000).

A análise foliar permite o diagnóstico rápido da necessidade ou não de suplementação dos nutrientes, principalmente os micronutrientes, uma vez que a avaliação das condições da planta e a definição de adubação desses elementos não podem ser detectadas apenas pela análise do solo. Quando se faz apenas a análise de solo, fatores como clima e os tratos culturais, que interferem na disponibilização dos nutrientes contidos nos fertilizantes aplicados, podem passar despercebidos, mascarando possíveis dificuldades que as raízes apresentam na absorção e transporte de tais nutrientes, importantes para o crescimento e frutificação das plantas (Basso & Dal Bó, 1988; Suzuki & Basso, 2002; Viegas, 2000).

O diagnóstico correto do estado nutricional e a confiabilidade nos resultados dependem diretamente da cor-

reta amostragem das folhas. Para isso, é necessário que se proceda a coleta e o preparo das amostras seguindo as recomendações específicas para cada cultura. Isso se deve ao fato de que as tabelas de interpretação foram estabelecidas com base em material localizado em partes específicas da planta e coletado em período pré-estabelecido, quando as folhas a serem amostradas atingiram maturação fisiológica e estão menos sujeitas a variações no teor de nutrientes.

Este trabalho tem por objetivo apresentar detalhadamente a metodologia de análise foliar empregada no Laboratório de Ensaio Químico da Epagri/ Estação Experimental de Caçador (Epagri/EECd), visando esclarecer e disponibilizar a metodologia empregada nas análises realizadas para produtores e pesquisadores que utilizam esse laboratório.

1 Estrutura do Laboratório de Ensaio Químico

O Laboratório de Ensaio Químico da Epagri/EECd é um importante prestador de serviço a empresas, produtores e pesquisadores de todo o estado de Santa Catarina. Inaugurado há mais de 20 anos, faz análises foliares das mais diversas culturas, sendo que cerca de 80% são de folhas de macieira, seguida por pecíolos de videira, folhas de pereira, de pessegueiro e de outras espécies, em quantidades menos expressivas. Anualmente, são realizadas cerca de mil análises foliares diretamente para produtores e cerca de quinhentas análises foliares para pesquisadores das diferentes estações experimentais da Epagri.

A Figura 1 apresenta o esquema das atividades do Laboratório de Ensaio Químico, desde a chegada das amostras até os procedimentos analíticos propriamente ditos.

Ressalta-se que o valor da análise foliar para a diagnose e monitoramento do estado nutricional depende, além da determinação analítica, da adoção de metodologias sistematizadas de amostragem e preparo das amostras. Sendo assim, esse tópico será brevemente abordado neste trabalho, apesar de não fazer parte da rotina do laboratório.

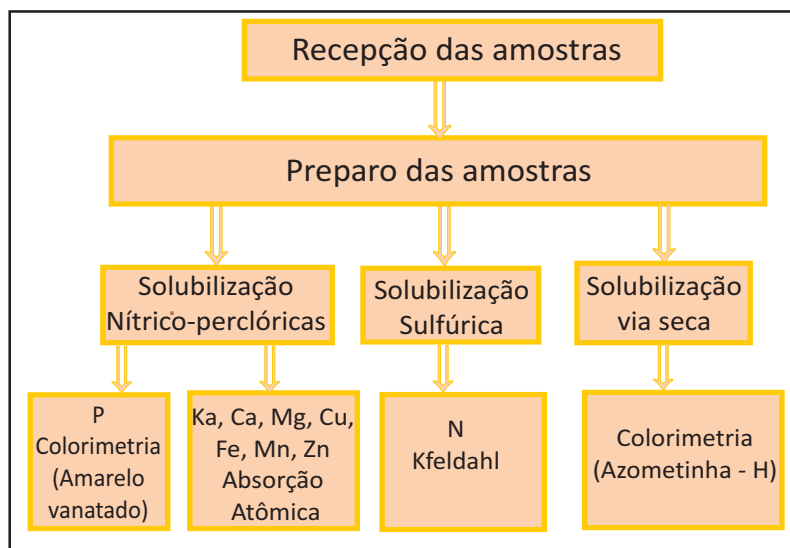


Figura 1. Representação esquemática das atividades do Laboratório de Ensaio Químico

2 Amostragem

Os agricultores devem ser bastante criteriosos e cuidadosos com a coleta do material durante a amostragem, processo determinante para a interpretação e confiabilidade dos resultados.

2.1 Cuidados especiais na coleta de folhas

Algumas situações de coleta de folhas para análise nutricional devem ser evitadas, tais como:

- Após chuva intensa;
- Após adubação foliar;
- Folhas com danos mecânicos;
- Folhas com danos por insetos;
- Folhas com infecção de doenças, exceto quando for de interesse para a possível diagnose;
- Folhas contaminadas com agrotóxicos ou poeira excessiva.

2.2 Como coletar as amostras de folhas

Cada amostra deve ser composta por aproximadamente 50 a 100 folhas, coletando-se quatro folhas por planta, em 25 plantas representativas e distribuídas aleatoriamente numa área homogênea, previamente subdividida em subáreas ou glebas. Para definir glebas, deve-se considerar: características do solo, idade das plantas, porta-enxerto, cultivar, produtividade e práticas culturais. Para a adequada amostragem de folhas, existem três critérios básicos que devem ser respeitados:

- Tipo de folha e localização na planta;
- Período de amostragem ou época recomendada;
- Homogeneidade e quantidade de material ou número de folhas adequado;

A Figura 2 ilustra a estrutura foliar a ser analisada, dividida entre pecíolo e limbo.

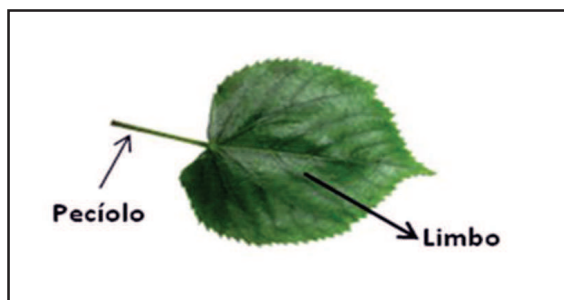


Figura 2. Ilustração da estrutura foliar

As principais espécies analisadas no Laboratório de Ensaio Químico da Epagri/EECd e a respectiva indicação de coleta de amostras foliares são:

- **Macieira, pereira e caquizeiro** - As folhas devem ser coletadas em torno de 100 a 120 dias após a brotação. Para as condições de clima temperado da região do Sul do Brasil, isso ocorre normalmente entre 15 de janeiro e 15 de fevereiro. Nestes casos a plena floração ocorre

- na primeira quinzena de outubro. Coletar folhas normais, completas (limbo + pecíolo), da parte mediana da brotação do ano, escolhendo ramos de crescimento médio na planta e evitando ramos com crescimento excessivo (ladrões), na altura mediana da copa e na parte externa da planta.
- **Pessegueiro, nectarina e ameixeira** - Coletar folhas completas (pecíolo + limbo) da parte mediana da brotação do ano, escolhendo ramos de crescimento médio da planta e evitando ramos verticais muito vigorosos, nos diferentes lados da copa das plantas. Devem ser coletadas entre a 13^a e a 15^a semana após a plena floração, independentemente de o cultivar ser precoce ou tardio. Se a época indicar a amostragem das folhas no período de maturação dos frutos, a coleta deverá ser antecipada em duas semanas, efetuada sempre antes da colheita dos frutos.
 - **Quivizeiro** - Coletar a 2^a folha completa (pecíolo + limbo) do ramo de crescimento, localizada depois dos frutos no sentido da ponta de crescimento do ramo anual. Para as condições de clima da região Sul, recomenda-se realizar amostragem no mês de fevereiro. A amostra deve ser composta por 50 folhas (devido ao tamanho das folhas o volume da amostra será bastante grande).
 - **Videira** – Para as regiões vitícolas de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, coletar a amostra entre 15 de janeiro e 15 de fevereiro, período que compreende o início da maturação ou mudança de cor das bagas. A análise pode ser feita nas folhas completas (pecíolo + limbo) ou apenas nos pecíolos, com a interpretação dos resultados baseada nos padrões das tabelas correspondentes. No caso de amostragem de pecíolos, a coleta deve ser feita das folhas recém-maduras, ou seja, as folhas mais novas que já completaram o crescimento. Já para as fo-

lhas completas (pecíolo + limbo), deve-se coletar a folha oposta ao primeiro cacho do ramo frutífero.

- **Outras culturas** – Para a interpretação dos teores de análise foliares é preciso seguir as orientações de coleta de folhas e tecido vegetal de acordo com as tabelas de interpretações-padrão para cada cultura. Na Região Sul são usadas as orientações da SBCS/NRS, presentes no *Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*.

2.3 Amostragens de material fora do período recomendado ou sem padrão de interpretação dos resultados

Neste caso, a coleta de folhas ou materiais vegetativos pode ser feita em qualquer época do ano. Recomenda-se anotar as características do sintoma ou de crescimento, verificando sua distribuição na área e na planta. Nessa situação, coletar folhas recém-maduras de quatro posições da parte mediana da planta e enviar ao laboratório no mínimo duas amostras compostas, uma de plantas saudáveis e outra de plantas com sintomas. Os resultados das duas amostras serão comparados para possíveis identificações das causas da sintomatologia apresentada.

3 Recepção das amostras

As amostras são recebidas diretamente no Laboratório ou podem ser enviadas pelo correio. Imediatamente as amostras são ordenadas segundo descrição do interessado e, em seguida, rigorosamente identificadas através de protocolo e etiquetas com o número do Laboratório.

As amostras devem ser acondicionadas adequadamente para que cheguem ao Laboratório em boas condições, de preferência colocadas em saco de papel limpo e devidamente identificado. Se possível, entregar as amostras imediatamen-

te no Laboratório. Se isso não for possível, efetuar uma pré-secagem à sombra, evitando, assim, que se inicie a deterioração das folhas por processo de fermentação e ataque de fungos, comum em amostras frescas acondicionadas em saco plásticos ou em altas temperaturas.

A Figura 3 apresenta um modelo do protocolo de recebimento das amostras que deve ser preenchido imediatamente ao seu recebimento e catalogação:

EPAGRI – EECd - Laboratório de Ensaio Químico	
Data: ___/___/___	Nº laboratório: _____
Nome do produtor/pesquisador: _____	
Endereço: _____	
Telefone: _____	Fax: _____
E-mail: _____	
CPF/CNPJ: _____	
Cultura/variedade: _____	
Quantidade de amostras: _____	
Identificação de amostras: _____	

Figura 3. Modelo de formulário de recebimento das amostras no Laboratório de Ensaio Químico

4 Limpeza das vidrarias

As análises realizadas no Laboratório de Ensaio Químico são de alta sensibilidade, uma vez que são determinadas concentra-

ções da ordem de mg/kg. Assim, qualquer traço de impureza ou contaminação nas vidrarias, reagentes e equipamentos empregados no Laboratório durante as análises, pode representar um grande erro na determinação da concentração correta dos nutrientes contidos nas amostras, podendo invalidar todo o resultado e ocasionar perda da amostra.

Desta forma, alguns procedimentos são adotados na lavagem de vidraria, para evitar possíveis contaminações:

- Lavar com água corrente, escovando por dentro e por fora do recipiente, e enxaguar duas vezes com água corrente abundante;
- Levar à estufa para secagem a 60°C;
- Após os vidros secos, adicionar solução de detergente para vidrarias de laboratório;
- Lavar várias vezes com água destilada;
- Enxaguar abundantemente com água deionizada;
- Levar novamente à estufa para secagem a 60°C.

5 Preparo das amostras

5.1 Secagem

Assim que as amostras chegam ao laboratório, primeiramente são ordenadas de acordo com a sequência estipulada e, posteriormente, catalogadas com a numeração do laboratório.

Em seguida, são acondicionadas em sacos de papel etiquetados e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar na temperatura de 60°C, por aproximadamente três dias ou até atingir a massa constante.

5.2 Moagem

A moagem da amostra é realizada em moinhos tipo Willey, com facas e câmara de aço inoxidável e com peneiras de 0,5 ou 1mm de diâmetro, visando assegurar a homogeneização da amostra. A amostra é então armazenada em sacos de plástico, em temperatura ambiente, até o momento das análises.

6 Solubilização das amostras (digestão)

A decomposição do tecido vegetal, para determinação dos nutrientes essenciais às plantas, é realizada por via seca, por calcinação em forno de mufla, ou por meio de solubilização com mistura de ácidos nítrico e perclórico ou, ainda, de solubilização sulfúrica (Concon & Soltess, 1973; Sarruge & Haag, 1974; Bataglia et al., 1983).

6.1 Solubilização via seca para determinação de Boro (B)

A amostra foliar é incinerada em forno tipo mufla a uma temperatura entre 500 e 550°C, por aproximadamente 2h. A cinza resultante é dissolvida em solução diluída de ácido sulfúrico. A metodologia empregada é a azometina-H, onde a determinação da quantidade de B é baseada na formação de um complexo de coloração amarela, resultante da reação do ácido bórico com o reagente azometina-H, e determinado espectrometricamente (Bataglia et al., 1983).

6.1.1 Materiais e equipamentos

- Mufla elétrica com controle de temperatura;
- Balança analítica;
- Cadinho de porcelana de 50ml;
- Espectrofotômetro UV-VIS.

6.1.2 Reagentes

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,36N;
- Ácido L-ascórbico ($C_6H_8O_6$);
- Acetato de amônia (CH_3COONH_4);
- EDTA (sal sódico);
- Azometina-H;
- Ácido acético glacial (CH_3COOH);
- Ácido clorídrico (HCl);
- Solução padrão de boro (*tritisol*).

6.1.3 Soluções

- **Solução azometina-H/ácido L-ascórbico** (para 100 amostras) - Em um balão volumétrico de 100ml, pesar 2g de ácido L-ascórbico e 0,9g de azometina-H e completar o volume com água deionizada;
- **Solução tampão** - Pesar 140g de acetato de amônia, 10g de EDTA, 10g de acetato de potássio e 4g de ácido nitrilotriacético; dissolver em 150ml de água deionizada e, lentamente, adicionar 62,5ml de ácido acético glacial; homogeneizar bem, de preferência em banho-maria, e completar o volume para 400ml;
- **Solução Azo-tampão** - Misturar em proporções iguais (1:1) as soluções Azometina-H/ácido L-ascórbico e a solução tampão;
- **Solução Padrão estoque de B (100ppm)** - Em um balão de 100ml, pipetar 1ml da solução padrão de B 1000ppm e completar o volume com água destilada;
- **Curva analítica (0, 1, 2 e 3ppm de B)** - Em quatro balões volumétricos de 100ml, adicionar sequencialmente 0, 1, 2 e 3ml da solução estoque de B 100ppm; completar o volume da solução com H_2SO_4 0,36N, guardando em frascos plásticos.
- **Ácido Sulfúrico 0,36N** - Pipetar 5ml de ácido sulfúrico concentrado em um balão de 500ml preenchido com aproximadamente 200ml de água deionizada e completar o volume com água deionizada.

6.1.4 Procedimento analítico

- Pesar 0,3g de amostra em cadinho de porcelana;
- Levar a amostra ao forno tipo mufla térmica com temperatura controlada e aumentar gradativamente a temperatura até 500°C, deixando nessa condição por aproximadamente por 2h;
- Retirar os cadinhos do forno mufla e deixar esfriar até que atinjam a temperatura ambiente; a cinza resultan-

- te desse processo deve ser dissolvida em 15ml de H_2SO_4 0,36N;
- Esperar a cinza decantar, por aproximadamente 24h.
 - Passar para um tubo de ensaio, pipetar 4ml do sobrenadante;
 - Adicionar 5ml da Solução Azo-tampão em cada amostra e agitar bem; deixar reagir para o desenvolvimento completo da cor por aproximadamente 1h;
 - Proceder à leitura das amostras em um espectrômetro UV-VIS (Figura 4), no comprimento de onda de 420nm. Não esquecer de construir a curva analítica;
 - Determinar a concentração do Boro, conforme cálculo.



Figura 4. Espectrofotômetro de UV-VIS

6.1.5 Cálculo

$$B \text{ mg/kg} = \text{Leitura mg/L} \times 50$$

6.2 Solubilização Sulfúrica para determinação de Nitrogênio (N)

Essa técnica se baseia na oxidação da matéria orgânica presente no tecido foliar, transformando o nitrogênio orgânico em mineral através da ação de ácido sulfúrico concentrado, peróxido de hidrogênio e canalizadores em temperatura elevada. A determinação do N pode ser realizada através do método Kjeldahl, ou com a amostra sólida no analisador elementar. O método empregado no laboratório é o Kjeldahl, que tem como princípio a solubilização úmida seguida por destilação e arraste a vapor e titulação para a quantificação de NH_4 . A solubilização sulfúrica (H_2SO_4 + catalizadores) transforma as proteínas e aminoácidos do tecido vegetal em N-NH_4^+ , que é destilado e complexado em ácido bórico com indicador misto, e titulado com solução padronizada de H_2SO_4 diluído (Sarruge & Haag, 1974; Bremner & Mulvaney, 1982; Tedesco et al., 1995; Bataglia et al., 1983; LABCONCQ, 2009).

6.2.1 Materiais e equipamentos

- Capela de exaustão;
- Balança analítica;
- Bloco digestor para 15 tubos de digestão;
- Destilador semimicro Kjeldahl;
- Conjunto com bureta automática e agitador magnético.

6.2.2 Reagentes

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4);
- Álcool etílico 99° ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$);
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%;
- Hidróxido de sódio (NaOH);

- Ácido bórico (H_3BO_3);
- Verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$);
- Vermelho de metila ($C_{15}H_{15}N_3O_2$);
- Ácido sulfúrico 1000ppm (Tritisol);
- Sulfato de cobre ($CuSO_4$);
- Selênio elementar em pó;
- Sulfato de potássio (K_2SO_4).

6.2.3 Soluções

- **Mistura catalítica** - Para 100 partes de K_2SO_4 , adicionar 10 partes de $CuSO_4$ e 1 parte de selênio elementar; misturar bem e levar a mistura à estufa a $60^\circ C$ por aproximadamente 30min. ou até clarear;
- **Indicador** - Pesar 0,198g de verde bromocresol e 0,132g de vermelho de metila; dissolver em 200ml de álcool etílico, sob agitação constante por cerca de 20min.
- **Indicador bórico** (preparo de 10L) - Em um balão volumétrico de 10L, colocar 200g de ácido bórico e dissolver em 1,5L de H_2O destilada. Manter sob aquecimento até a dissolução completa do sal; adicionar os 200ml preparados de indicador e mais 1,5L de álcool etílico; completar o volume (10L) com água deionizada.
- **Solução estoque de H_2SO_4** - Transferir uma ampola de Tritisol® de H_2SO_4 concentrado (98%) para balão volumétrico de 1L e completar o volume com água deionizada;
- **NaOH 5N** - Dissolver 1kg de NaOH em 5L de água deionizada.

6.2.4 Procedimento analítico

- Pesar 0,2g de amostra nos tubos para digestão macro;
- Adicionar 1g da mistura catalítica;
- Adicionar 2ml de H_2O_2 30%;
- Adicionar 5ml de H_2SO_4 concentrado.

Os tubos devem ser levados ao bloco digestor por uma hora ou mais, aumentando a temperatura gradativamente até

380°C. Após a completa digestão da matéria orgânica, caracterizada por um líquido incolor ou levemente esverdeado, determinar o teor de nitrogênio. Durante a digestão, colocar pequenos funis tampando o tubo digestor, para evitar a evaporação completa do extrato.

- Deixar esfriar;
- Ao extrato digerido no tubo de digestão são acrescentados 20ml de água deionizada, transferido-o para o destilador semimicro Kjeldahl (Figura 5);
- Conectar, na extremidade de refrigeração do destilador, um erlemeyer de 125ml contendo 10ml de solução de H_3BO_3 20g/L com a mistura de indicadores (Figura 5 B);
- Adicionar gradativamente ao extrato 10ml de NaOH 5N. Devido à mudança de pH, ocorre a transformação do nitrogênio que estava na forma de Sulfato de Amônia (NH_4SO_4) para Amônia (NH_4^+), que é volátil e sofre a destilação, sendo novamente fixado pela solução de H_3BO_3 + indicadores;
- Proceder a destilação até atingir um volume aproximado de 50ml;
- Retirar o erlemeyer e titular com H_2SO_4 0,05N até o ponto de viragem, caracterizado pelo aparecimento da cor rosa.

OBS.: Uma prova em branco deve ser analisada conjuntamente com as amostras.

6.2.5 Cálculo

$$N-NH_4 \text{ g/ kg} = (V_a - V_b) \times 1,4$$

Onde V_a = volume de H_2SO_4 gasto na amostra (ml);
 V_b = volume de H_2SO_4 gasto no branco (ml).



Figura 5. Destiladores semimicro Kjeldal, utilizados para determinar a quantidade de N no extrato, em diferentes fases do processo analítico. A: tubo de digestão contendo o extrato digerido; B: Erlemeyer para recepção do destilado

6.3 Solubilização nitro-perclórica para determinação de macro (P, Mg, Ca, K) e micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu)

As amostras de tecido foliar são solubilizadas em tubos de digestão com misturas de ácido nítrico (65%) e ácido perclórico (70%) na proporção de 6:1 (v/v), sendo levadas ao bloco digestor e elevando-se gradativamente a temperatura até 190°C (Sarruge & Haag, 1974; Bataglia et al.,1983; Tedesco et al.,1985). Lantânio é adicionado às diluições, como solução estabilizadora, para evitar interferência na determinação do cálcio.

6.3.1 Materiais e equipamentos

- Capela de exaustão;
- Balança analítica;
- Bloco digestor para 40 tubos de digestão;
- Espectrofotômetro UV-Vis, para leitura colorimétrica da concentração do fósforo;
- Espectrômetro de absorção atômica, para leitura das concentrações de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn);
- Lâmpada de cátodo oco de Ca, K, Mg, Cu, Fe, Zn e Mn;
- Banho-maria.

6.3.2 Reagentes

- Ácido perclórico (HClO_4) 70%;
- Ácido nítrico (HNO_3) 65%;
- Óxido de lantânio (La_2O_3);
- Ácido clorídrico concentrado ($\text{HCl}_{(\text{conc})}$);
- Ácido sulfúrico concentrado ($\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$);
- Molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$);
- Vanadato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$);
- Padrão Tritisol® de 1000ppm de Ca, K, Mg, Cu, Fe, Zn e Mn.

6.3.3 Soluções

- **Mistura ácida** - Misturar o ácido nítrico e o ácido perclórico, na proporção 6:1, respectivamente;
- **Solução de lantânio 5%** - Pesar 58,6g de La_2O_3 em um balão volumétrico de 1000ml e adicionar 250ml de ácido clorídrico concentrado. Completar o volume com água deionizada;
- **Solução de lantânio 0,125%** - Diluir a partir da solução de La 5%. Para preparar 1000ml, pipetar 25ml da solução de La 5% em balão volumétrico de 1000ml e completar com água destilada;
- **Solução Branco** - Dissolver 15ml de ácido perclórico em balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com água deionizada.

- **Solução de Molibdato 50 g/L** - Dissolver 50g de $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$ em 800ml de água deionizada quente em balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com água deionizada; manter a solução na geladeira, em frasco âmbar ou revestido de papel laminado.
- **Solução de Vanadato 2,5g/L** - Dissolver 2,5g de $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$ em 500ml de água deionizada quente; adicionar 350ml de HNO_3 65% e completar o volume no balão volumétrico de 1000ml com água deionizada; manter a solução na geladeira, em frasco âmbar ou revestido de papel laminado.
- **Solução Indicadora para determinação de P** - Na hora do uso, misturar, em partes iguais, as soluções de molibdato 50g/L e vanadato 2,5 g/L, conforme o volume necessário pelo número de amostras.
- **Curvas Analíticas:**
 - i) *Micronutrientes*: preparar, a partir da solução de Tritisol® de Fe, Mn, Cu e Zn 1000 g/L, padrões com misturas de Fe, Mn e Cu nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 6 e 12ppm e Zn nas concentrações de 0,0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 e 1,2ppm, em soluções ácidas.
 - ii) *Macronutriente Ca*: preparar, a partir da solução de Tritisol® de Ca 1000g/L, padrões com concentração de Ca de 0, 2, 4, 6 e 8ppm em solução ácida e com 2ml de lantânio 5% para cada balão volumétrico de 100ml, em cada ponto da curva analítica.
 - iii) *Macronutriente K e Mg*: preparar, a partir da solução de Tritisol® de K e Mg 1000g/L, padrões com misturas de K e Mg nas concentrações de 0,0 e 0,0; 2,0 e 0,5; 4,0 e 1,0; 6,0 e 2,0ppm, respectivamente, em soluções ácidas.
 - iv) *Macronutriente P*: preparar solução padrão de P contendo 0, 4, 8 e 12ppm para cada ponto da curva em meio ácido.

6.3.4 Procedimento analítico

- Pesar 0,5g das amostras foliares diretamente em tubos para digestão de 50ml;
- Adicionar 5ml da mistura Nitro-perclórica;
- Levar os tubos ao bloco digestor, aumentando a temperatura gradativamente até cerca de 190°C e mantendo-a por aproximadamente 2h;
- Adicionar cerca de 20ml de água deionizada e levar as amostras ao banho-maria por aproximadamente 2h;
- Em seguida, completar o volume nos próprios tubos de digestão para 50ml com água deionizada.

6.3.5 Determinação das concentrações de Cu, Fe, Zn, Mn, Ca, K e Mg

A determinação é realizada em espectrômetro de absorção atômica (EAA – Figura 6). A técnica é sensível para a determinação quantitativa de mais de sessenta elementos metálicos e metaloides (Holler et al., 2009). Nessa metodologia, a solução-amostra é aspirada e nebulizada em uma chama produzida a partir da mistura ar-acetileno, convertida em vapor atômico. Alguns desses átomos serão termicamente excitados pela chama, mas a maioria deles permanecerá em seu estado fundamental. Para serem excitados, os átomos precisam absorver a radiação específica proveniente de uma lâmpada de cátodo oco, que emite radiação no mesmo comprimento de onda que será absorvido por eles na chama. Os metais das soluções aspiradas na chama, com temperatura entre 2.000 e 2.500°C, transformam-se em seu estado fundamental. Cada elemento químico absorve a energia em um comprimento de onda definida.



Figura 6. Espectrofotômetro de Absorção Atômica

- i) Determinação das concentrações de Fe, Mn, Cu e Zn:* Realizar a leitura do extrato proveniente da solubilização nítrico-perclórica, no aparelho de Espectrofotometria de Absorção Atômica (Figura 6).
- ii) Determinação das concentrações de Ca, K e Mg:* Pipetar 2ml do extrato da solubilização nítrico-perclórica e acrescentar 20ml de água deionizada; em seguida,

pipetar 2,5ml deste extrato em tubos de ensaio e acrescentar 10ml de Lantânio 0,125; realizar a leitura no aparelho de Espectrofotometria de Absorção Atômica (Figura 6).

6.3.6 Espectrometria UV-VIS com determinação colorimétrica pelo método de amarelo de vanadato – molibdato de amônia para a determinação da concentração de P

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

- i) Pipetar 2ml do extrato proveniente da solubilização nítrico-perclórica e adicionar 8ml da solução branco; adicionar 4ml da solução indicadora para determinação de P e deixar reagir por aproximadamente 1h;
- ii) Efetuar a leitura no espectrômetro de UV-VIS (Figura 4) em 420nm, determinando inicialmente a curva analítica; realizar o mesmo procedimento nas amostras tomando apenas os pontos da curva previamente preparadas e determinar a concentração de P contidos no extrato solubilizado;
- iii) Cálculo $\text{P g/kg} = \text{leitura em mg/L} \times 0,2$

REFERÊNCIAS

1. BASSO, C.; DALBÓ, M.A. Análise foliar na fruticultura de clima temperado. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, SC, v.1, n.4, p. 23-25, 1988.
2. BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de Análise Química de Plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78).
3. BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen – Total. In: PAGE, A.L. et al. (Eds.). **Methods of Soil Analysis**. Part. 2: Chemical and Microbiological Properties. 2.ed. Madison, Wisconsin: Am. Soc. Agr./Soil Sci. Soc. Am., 1982. p. 595-624. (Agronomy series, 9).
4. CARMO, C.A.F.S.; ARAÚJO, W.S.; BERNARDI, A.C.C.; SALDANHA, M.F. **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos**. Dez. 2000. (Circular técnica, 6).
5. CONCON, J.M.; SOLTESS, D. **Rapid microkjeldahl digestion of cereal grains and other biological materials**. Analytical Biochemistry, v.53, n.1, p.35-41, 1973.
6. HOLLER, J.F; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
7. LABCONCO. **To Kjeldahl Nitrogen determination methods and apparatus**. Houston, Texas, USA: ExpotechUSA, 2005. Disponível em: <<http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2009.
8. SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise químicas em plantas**. Piracicaba: Depto de Química, ESALq. 1974, 56p. (Publicação especial).

9. SBCS/NRS. Comissão de Química e Fertilidade do Solo -- RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: SBCS-NRS, 2004. 400p.
10. SCHVEITZER, B.; SUZUKI, A. **Laboratório de Ensaio Químico: análise de Tecido Foliar**. Florianópolis: Epagri, 2011. (Folder).
11. SUZUKI, A.; BASSO, C. Solos e Nutrição da Macieira. In: Epagri. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2002. p.335-381.
12. TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 188p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
13. VIEGAS, P.R.A. **Análise foliar na citricultura: um instrumento necessário ao processo produtivo**. Disponível em: <http://www.citrograf.com.br/download/analise_foliar_citricultura.pdf>. Acesso em: 28 ago 2012.