

## **Avaliação do método de adição de padrão para determinação de Co e Mo em tecido vegetal via ICP-OES**

QUAREZEMIN, M.A.K.<sup>1</sup>; MANTOVANI, A.L.<sup>2</sup>; GERMANO, M.G.<sup>2</sup>; CASTRO, C. de<sup>3</sup>; OLIVEIRA JUNIOR, A. de<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UTFPR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, melinakaizerutfpr@gmail.com; <sup>2</sup>Embrapa Soja, Laboratório de Análise de Solo e Tecido Vegetal; <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

### **Introdução**

O tecido vegetal é composto por elementos essenciais que são avaliados através da análise química para determinar o estado nutricional das plantas (SILVA, 2009). As plantas absorvem os elementos minerais essenciais em quantidades específicas necessárias ao seu desenvolvimento, sendo a quantidade o critério que define os nutrientes em macronutrientes e micronutrientes. São considerados macronutrientes primários os elementos nitrogênio (N), fósforo ( $P_2O_5$ ) e potássio ( $K_2O$ ) por serem requeridos em grandes quantidades, assim como o cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Estes elementos fazem parte de moléculas essenciais e possuem função estrutural nas plantas. Já os micronutrientes são aqueles elementos requeridos em pequenas quantidades, como o boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn); estes constituem estruturas enzi-

máticas e têm função reguladora. Malavolta (2006) ainda acrescenta três micronutrientes à lista dos essenciais: o cobalto (Co), o níquel (Ni) e o selênio (Se).

O Mo é necessário para a síntese e ativação (co-fator) da nitrato redutase, enzima que reduz o nitrato nas plantas no processo de fixação biológica do N (FBN) pelas bactérias simbióticas. A maior parte do Mo presente no solo está em formas oclusas, no interior de minerais primários e secundários. O intemperismo desses minerais libera íons molibdato, cuja solubilidade aumenta em condições alcalinas. Os sintomas de deficiência de Mo consistem geralmente no amarelecimento das folhas e diminuição no crescimento vegetal. No caso das leguminosas como a soja (*Glycine max*), a falta de Mo provoca sintomas de deficiência de N em função do decréscimo na fixação de N pela planta. O Co é um nutriente absorvido pelas raízes como  $\text{Co}^{2+}$ , considerado móvel no floema, o que causa sua acumulação nas margens e pontas das folhas. É essencial para fixação do N, pois participa na síntese de cobamida e da leghemoglobina nos nódulos. Sua deficiência causa clorose total, seguida de necrose nas folhas mais velhas (MANEJO DO SOLO, 1993).

O método padrão para análise de Mo e Co em tecido vegetal tem como princípio a análise dos metais dissolvidos na solução (extrato ácido) (GINÉ-ROSIAS, 1998) por técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Durante a transição dos átomos do estado excitado para o estado fundamental, cada elemento químico emite um sinal de comprimento de onda definido. O sinal obtido é captado por um detector, registrado e convertido em unidades de concentração. Porém, este método possui limitações que envolvem os Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD), principalmente para analitos encontrados em baixas concentrações, como é o caso do Co e Mo.

A adição de padrão analítico é uma alternativa ao método convencional muito empregada em análises por espectrometria de absorção ou de emissão atômica. Consiste na adição de quantidades conhecidas do padrão analítico (*spiking*) em diferentes concentrações, seguida pela

determinação da concentração do analito adicionado. Isso é possível a partir da equação da reta, que tem seu eixo x com as concentrações das amostras e no eixo y tem-se a área quantificada dos espectros em questão. A adição padrão é especialmente apropriada quando a composição da amostra é complexa e afeta o sinal analítico (HARRIS, 2005).

Este trabalho avaliou a eficiência analítica da técnica de adição de padrão, quanto a capacidade de melhorar a detecção de Co e Mo via ICP-OES em folhas de soja.

## **Material e Métodos**

### **Seleção das amostras**

A variedade BRS 1010IPRO possui ciclo precoce, tipo de crescimento indeterminado, excelente resistência ao acamamento e arquitetura de planta favorável ao manejo fitossanitário. Foram selecionadas 5 amostras com distintos tratamentos para folhas de soja coletadas nos estádios V1 (unifoliolada) e R2 (3º trifólio, sem pecíolo), de acordo com a escala proposta por Fehr e Caviness (1977), com três repetições a campo cada (Tabela 1), num total de 15 amostras. Para fins estatísticos, cada uma das amostras foi analisada em triplicata, totalizando 45 amostras de laboratório.

### **Digestão úmida de tecido vegetal via micro-ondas**

Foram utilizados 0,5 g de tecido vegetal, e o volume final foi aferido para 15 mL (diluição de 30x). As amostras foram digeridas em Forno de Micro-ondas Marca CEM, Modelo Mars Xpress, utilizando-se 6 mL de solução aquosa de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), e 2 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 130 V. A partir de cada uma das 45 amostras analisadas, foram retiradas 4 alíquotas de extrato ácido, que foram utilizadas para adição dos padrões de Co e Mo, nas concentrações descritas na Tabela 2, totalizando 180 leituras.

### Determinações analíticas

Como equipamento analítico foi utilizado o Espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), marca PerkinElmer, modelo *Optima 8300* (Dual View).

### Tratamento estatístico

As intensidades de emissão atômica obtidas a partir das leituras em ICP-OES para as quatro concentrações dos analitos (Tabela 2) foram utilizadas para a determinação do intercepto e da inclinação da reta, para posterior cálculo da concentração de Co e Mo. A determinação da concentração foi feita por extrapolação (Figura 1). As médias de concentração foram dadas em mg/kg do elemento na amostra.

Outro teste estatístico utilizado foi proposto por Leite & Oliveira (2002), para verificar se houve identidade entre os métodos. Este procedimento é empregado para comparar duas variáveis dependentes quantitativas, combinando três testes: i) o teste  $F(H_0)$  para verificar simultaneamente se os estimadores do modelo de regressão linear  $b_0$  e  $b_1$  são iguais a 0 e 1, respectivamente; ii) o teste t para o erro médio ( $t_{\text{erro médio}}$ ), que avalia se existe algum viés (bias) entre as variáveis e está relacionado a acurácia e/ou precisão do método proposto em relação ao método padrão; e iii) análise do coeficiente de correlação linear ( $r_{yij}$ ) em comparação ao erro médio [ $(r_{yij}) \geq |1 - \text{erro médio}|$ ]. Com base nessas estatísticas, é proposta uma regra de decisão para o teste de hipótese de identidade entre dois grupos de dados quantitativos. Os métodos são considerados idênticos quando os resultados para os três testes forem:

$$\text{a) } F(H_0) = \text{ns}; \quad t_{\text{erro médio}} = \text{ns}; \quad [(r_{yij}) \geq |1 - \text{erro médio}|] = \text{Sim}$$

$$\text{b) } F(H_0) = *; \quad t_{\text{erro médio}} = \text{ns}; \quad [(r_{yij}) \geq |1 - \text{erro médio}|] = \text{Sim}$$

### Resultados e Discussão

As médias de concentração de Co e Mo para os métodos sem e com adição de padrão estão sumarizadas na Tabela 3.

No tratamento sem CoMo (controle, método padrão) de amostras de folhas unifolioladas, somente o Co foi detectado, e a sensibilidade da técnica, tanto para método convencional quanto para adição de padrão, permaneceu praticamente inalterada, com aumento pouco pronunciado no sinal analítico. A aplicação do CoMo no TS por si só, já possibilitou a determinação destes nutrientes nas amostras de folha unifoliolada, sendo que, a técnica da adição de padrão não trouxe ganhos neste caso, pelo contrário, já que os teores de Co e Mo foram inferiores aos medidos de forma direta (padrão).

Para as amostras coletadas no estágio R2, para o tratamento controle (S/ CoMo) a adição de padrão não melhorou a sensibilidade e a consequente detecção de sinal, visto que, somente na repetição 3 se obteve concentração de Co e Mo superiores ao Limite de Quantificação do equipamento. Nos tratamentos com aplicação de CoMo, seja no TS ou via foliar, as médias de concentração para Mo apresentaram discreto aumento para o método de adição de padrão, entretanto, o Co também não foi detectado com confiabilidade analítica, indicando que essa técnica, melhoraria, parcialmente a determinação de CoMo, utilizando o ICP-OES.

O método de adição de padrão é geralmente empregado em análises por espectrofotometria de absorção atômica ou de emissão, para validação de métodos ou para avaliar a especificidade e a sensibilidade. Estes termos definem a capacidade do método de detectar o analito de interesse em presença de outros componentes (interferentes) na matriz (BRITO et al., 2003). No presente trabalho este método foi utilizado com o objetivo de aumentar a sensibilidade do sinal analítico, visando a detecção de Co e Mo, cuja concentração pode ser calculada por extrapolação (indireta).

O teste proposto por Leite & Oliveira (2002) (Figura 2) demonstrou que houve identidade estatística entre as concentrações de Co e Mo determinadas em ICP-OES pelo método convencional e com adição de padrão, indicando que esta técnica foi adequadamente aplicada. Em ambos os casos, a identidade foi verificada pelo atendimento das pressuposições do teste t para o erro médio, que não foi significativo.

## Conclusão

Houve identidade estatística entre os métodos, portanto, a técnica foi bem empregada. Entretanto, a adição de padrão não permitiu detectar Co e Mo em condições que o método padrão não detectou, ou seja, não melhorou a capacidade de quantificação destes micronutrientes, via ICP-OES.

Ainda assim, como se trata de um primeiro ajuste da técnica de adição de padrão, novos estudos deverão ser conduzidos procurando ajustar os parâmetros do método, tais como, doses de Co e Mo adicionadas, amplitude de curva de calibração e diluições.

## Referências

- BRITO, N.; AMARANTE-JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1981. 12 p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).
- GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Piracicaba: CENA, 1998. 148 p.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.
- LEITE, H. G.; OLIVEIRA, F. H. T. Statistical procedure to test the identity of analytical methods. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 33, n. 7-8, p. 1105-1118, 2002.
- MANEJO DO SOLO. In: **RECOMENDAÇÕES técnicas para a cultura da soja no Paraná 1993/94**. Cascavel: OCEPAR; Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1993. p. 16-29. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 62).

SILVA, F. C. da. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 627 p.

**Tabela 1.** Descrição das amostras

Amostra	BRS1010 IPRO	Tratamento	Repetição (campo)	Repetição (Laboratório)	
1	Folha unifoliolada	<i>Controle</i> <sup>1</sup>	R1	1,2,3	
			R2	1,2,3	
			R3	1,2,3	
2		Folha unifoliolada	<i>CoMo no TS</i> <sup>2</sup>	R1	1,2,3
				R2	1,2,3
				R3	1,2,3
3	Folha unifoliolada		<i>Controle</i> <sup>1</sup>	R1	1,2,3
				R2	1,2,3
				R3	1,2,3
4		Trifólio (R2)	<i>CoMo Foliar</i> <sup>3</sup>	R1	1,2,3
				R2	1,2,3
				R3	1,2,3
5	Trifólio (R2)		<i>CoMo TS</i> <sup>2</sup>	R1	1,2,3
				R2	1,2,3
				R3	1,2,3

<sup>1</sup>sem CoMo; <sup>2</sup>aplicação de CoMo no tratamento de semente; <sup>3</sup>aplicação de CoMo foliar (estádio V3/V4)

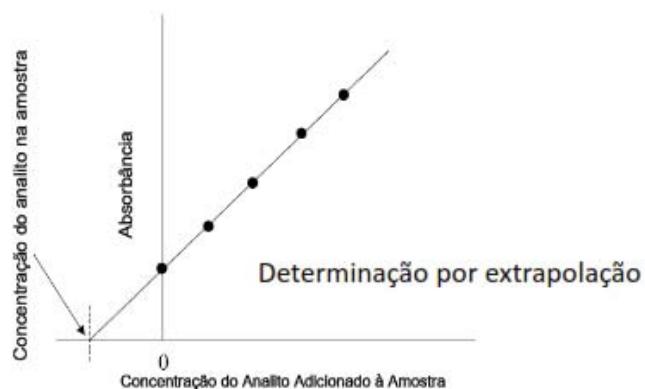
**Tabela 2.** Concentrações utilizadas no método de adição de padrão para Co e Mo

Alíquotas	Co (mg/L)	Mo (mg/L)
1	0 (s/ adição)	0 (s/ adição)
2	0,008	0,032
3	0,0125	0,05
4	0,025	0,1

**Tabela 3.** Estatística descritiva apresentando as concentrações de Co e Mo nas amostras analisadas

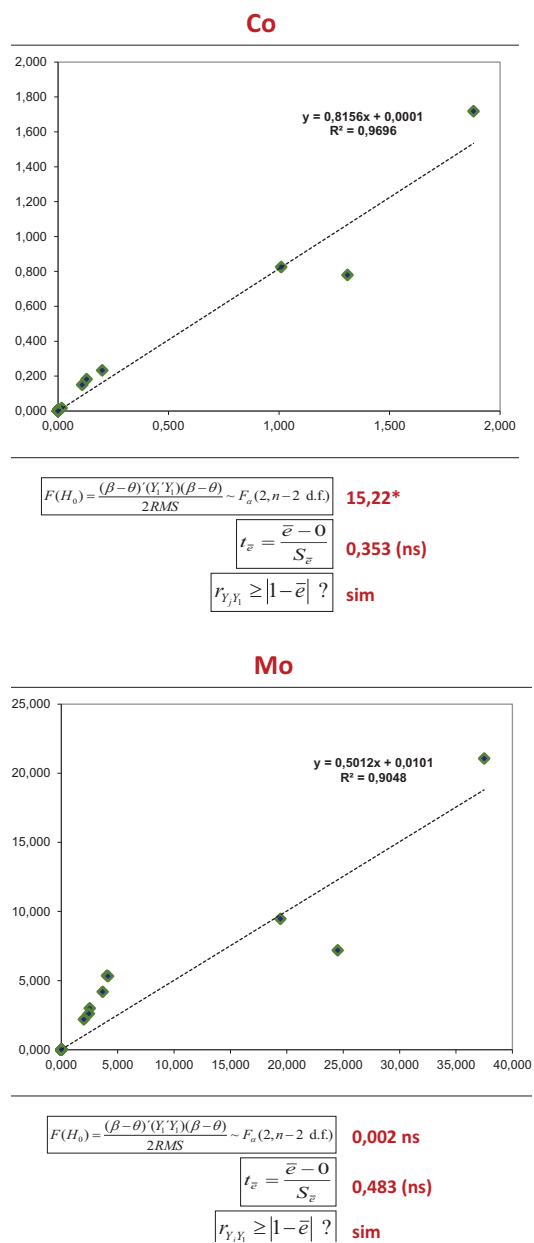
Amostra	Repetição	Estádio Fenológico	Tratamento	Co		Mo	
				Média (mg/kg)		Média (mg/kg)	
				Sem Adição	Com Adição	Sem Adição	Com Adição
1	R1	V1	S/ CoMo <sup>1</sup>	0,11	0,15	ND <sup>4</sup>	ND
	R2			0,13	0,18	ND	ND
	R3			0,20	0,23	ND	ND
2	R1	V1	CoMo no TS <sup>2</sup>	1,31	0,78	24,51	7,20
	R2			1,88	1,72	37,49	21,06
	R3			1,01	0,82	19,43	9,47
3	R1	R2	S/ CoMo	ND	ND	ND	ND
	R2			ND	ND	ND	ND
	R3			ND	0,06	ND	1,66
4	R1	R2	CoMo via foliar <sup>3</sup>	ND	0,01	2,52	3,00
	R2			0,02	0,02	2,44	2,61
	R3			ND	ND	2,00	2,19
5	R1	R2	CoMo no TS	ND	ND	4,05	5,36
	R2			ND	0,01	3,66	4,18
	R3			ND	ND	4,15	5,31

<sup>1</sup>Controle sem CoMo; <sup>2</sup>CoMo no tratamento de semente (TS); <sup>3</sup>tratamento CoMo via foliar; <sup>4</sup>ND: não detectado



**Figura 1:** Gráfico do cálculo da concentração do analito por extrapolação.





**Figura 2.** Modelos de regressão linear ajustados para as concentrações de Co e Mo testados no método convencional e as concentrações na condição de adição de padrão.