

**Desenvolvimento de um método para preparar amostras de material de planta para a determinação de Ca, Cu, Mg, Mn, Fe e Zn por FAAS****Development of a method to prepare samples of plant material for the determination of Ca, Cu, Mg, Mn, Fe and Zn by FAAS**

DOI:10.34115/basrv4n3-085

Recebimento dos originais:03/05/2020

Aceitação para publicação:08/06/2020

**Roseli Martins De Souza**

Doutora em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Instituição: Professora na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Athos da Silveira Ramos Avenue, 149, Bloco A, 5º andar, sala 517, Centro de Tecnologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro – Brasil – CEP 21941-909.

E-mail: roselimartins@iq.ufrj.br

**Monalisa Santana Coelho**

Mestre em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7 (antiga Rodovia Rio/São Paulo) Bairro Ecologia, Caixa

Postal: 74.505 CEP: 23891-000 - Seropédica – RJ – Brasil

E-mail: monalisa.coelho@embrapa.br

**Bruno José Rodrigues**

Pós-Doutor em Edinburgh University School Of Geosciences

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7 (antiga Rodovia Rio/São Paulo) Bairro Ecologia, Caixa

Postal: 74.505 CEP: 23891-000 - Seropédica – RJ – Brasil

E-mail: bruno.alves@embrapa.br

**RESUMO**

A quantificação de elementos como Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn, nutrientes essenciais para o crescimento das plantas, é de grande relevância para a avaliação da saúde nutricional das plantas, pois permite o diagnóstico precoce de deficiências, a sua correção e de outros problemas que possam causar danos ambientais e agrícolas. A preparação de amostras de tecido de plantas usada tradicionalmente exige grandes volumes de ácidos inorgânicos concentrados, e altas temperaturas, gerando vapores e resíduos que apresentam riscos à saúde e segurança do analista, além de possíveis problemas ambientais. Portanto, este estudo desenvolveu um método mais suave de preparação de

tecidos vegetais, conhecido como “verde” ou “limpo”, que utiliza apenas ácido nítrico 5M, peróxido de hidrogênio a 12% com aquecimento por microondas em um sistema fechado, eliminando a geração de vapores ácidos e o uso de ácido perclórico. O método obteve redução do tempo necessário para a dissolução de amostras de plantas difíceis de oxidar, como folhas de soja, farinha de aveia e trigo, milho e feijão.

**Palavras-Chave:** Tecido de planta, FAAS, micro-ondas, nutrientes essenciais

## **ABSTRACT**

The quantification of elements such as Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P and Zn, which are essential nutrients for plant growth, is of great relevance for the evaluation of plant nutrition health since it enables a nearly diagnosis of deficiencies, and the correction of this and other problems that could cause environmental and agricultural problems. The used preparation of plant tissue samples traditionally requires large volumes of concentrated inorganic acids such as nitric and perchloric acids, and high temperatures, generating vapors and residues that pose risks to the health and safety of the analyst as well as possible environmental problems. Therefore, this study developed a milder plant tissue preparation method, known as “green” or “clean” that uses only 5M nitric acid, 12% hydrogen peroxide with microwave heating in a closed system, eliminating the generation of acid fumes and the use of perchloric acid. The method achieved reduction of the time necessary for the dissolution of plant samples that are difficult to oxidize, such as soybean leaves, oat and wheat flour, maize and beans.

**keywords:** plant tissue, FAAS, microwave, essential nutrients

## **1 INTRODUÇÃO**

A quantificação de minerais (nutrientes) em tecidos vegetais, além de ser útil para o cálculo de adubação, também é muito importante no diagnóstico precoce e na correção de problemas nutricionais que podem afetar toda produção agrícola com grandes perdas de produtividade e danos à área de plantio (Merchant, 2010). Nas últimas décadas, o conhecimento dessas concentrações permitiu o dimensionamento e aplicação correta de fertilizantes contribuindo para um aumento na produtividade (Soil and Plant Analysis Council, INC., 1998). As determinações de elementos químicos nas plantas, considerados nutrientes ou não, também são muito importantes na quantificação das quantidades tóxicas para vegetais e animais, incluindo o homem. Os sintomas causados pelo excesso ou pela falta desses nutrientes essenciais nas plantas são normalmente, semelhantes, tais como, mudança da cor e do formato das folhas, atraso ou adiantamento de ciclos, aumento ou redução da produção, entre outros (Kirkby & Romheld, 2007). Mas, podem ser distinguidos pela quantificação desses elementos através da análise do tecido vegetal. A amostra vegetal, sólida, precisa ser preparada por oxidação ácida para a completa dissolução em uma solução contendo os analitos, adequada para quantificação por FAAS (Espectrometria de Absorção Atômica por Chama) ou ICP OES (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente

Acoplado). O preparo tradicional usa grandes volumes de ácidos concentrados como o nítrico e o perclórico, e altas temperaturas, com risco de explosão, liberação de vapores e resíduos tóxicos e insalubres para o analista e o meio ambiente. A substituição deste método por outros mais brandos, conhecidos como “verdes”<sup>1</sup>, por eliminarem ou reduzirem resíduos e reagentes tóxicos e perigosos, é uma tendência<sup>2</sup> e também uma exigência da legislação brasileira e de normas internacionais (Keith et al, 2007; Silva, et al, 2010; Souza, et al, 2006) Assim, este trabalho propõe um método de preparo de amostra mais brando, que utiliza apenas ácido nítrico e peróxido de hidrogênio diluídos, com aquecimento por micro-ondas em sistema fechado, eliminando a geração de vapores ácidos e o uso de ácido perclórico, com redução do tempo necessário para a dissolução de amostras vegetais de difícil oxidação.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **2.1 REAGENTES**

Os reagentes utilizados foram: Ácido Nítrico P.A 65%, Peróxido de Hidrogênio P.A. 30 %, Ácido Perclórico P.A 70%, Ácido sulfúrico P.A 95-99%, Carbonato de Bismuto Básico P.A, Óxido de Lantânio III P.A, Ácido Clorídrico P.A. 37% todos da marca Vetec; Soluções-padrão comerciais para AA 1,000 mg mL<sup>-1</sup> de magnésio, cálcio, ferro, zinco, manganês e cobre, da marca Quemis High Purity e água ultrapura Mili-Q (MERCK MILIPORE).

### **2.2 AMOSTRAS**

As amostras utilizadas foram: feijão-preto marca Combrasil, farelo de aveia, farelo de trigo e extrato de soja da marca Jasmine e Folha de Soja fornecida pelo Ensaio de Proficiência de Tecido Vegetal desenvolvido pela Embrapa Pecuária Sudeste (amostra de referência). Foram moídas em moinho de facas do tipo Wiley e posteriormente em moinho de faca IKA, até a obtenção de um pó com granulometria fina como farinha de trigo exceto a amostra de fubá e folha de soja, cuja granulometria foi considerada adequada.

### **2.3 EQUIPAMENTOS**

Para o preparo de amostra pelo método de digestão nitro-perclórica convencional utilizaram-se blocos digestores modelo TE-40, da marca Tecnal com 40 posições e tubos de vidro borossilicato temperado.

Para as quantificações de Ca, Mg, Fe, Zn, Mn e Cu foi utilizado o Espectrômetro de Absorção Atômica da Marca Shimadzu, modelo AA3800 na modalidade de atomização por chama

de composição Ar-Acetileno AA na proporção 0,6-4,9, com a configuração descrita na Tabela 1 abaixo para os elementos citados.

Tabela 1 - Configuração do Espectrômetro de Absorção Atômica

Elemento*	Comprimento de onda (nm)	Largura da fenda (nm)	Fluxo de gás (L min <sup>-1</sup> )
Ca	422,7	0,5	2,0
Mg	285,2	0,5	1,8
Fe	248,2	0,2	2,2
Mn	279,5	0,2	2,0
Cu	324,8	0,5	1,8

\*Configuração recomendada pelo fabricante

Para os experimentos de desenvolvimento de metodologia alternativa para preparo de amostras de tecido vegetal foi utilizado o forno de micro-ondas da marca CEM modelo MARSXpress com o rotor e tubos MARSXpress<sup>TM</sup> de teflon com jaquetas protetoras de Kevlar.

Em todas as etapas foram usadas pipetas automáticas da marca Gilson, de volume variável de 2 a 20 µL, de 20 a 200 µL, de 200 a 1000 µL e de 1,0 a 10,0 mL.

Para a pesagem das amostras foi utilizada a balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY220, da Figura 18, com precisão para 0,1 mg.

## 2.4 MÉTODOS

### Preparo das amostras

#### Método Tradicional:

Após moagem, 0,3 g da amostra foram pesadas e adicionadas a 5,0 mL da mistura nitro-perclórica (2:1) e aquecidas em bloco digestor a 150°C por 4 horas. Suas soluções foram inseridas no FAAS diretamente após a digestão sem nenhuma etapa de diluição.

#### Método desenvolvido:

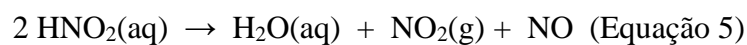
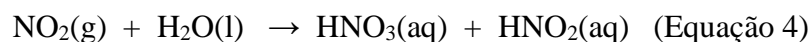
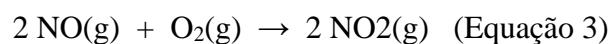
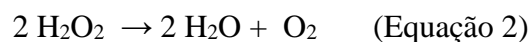
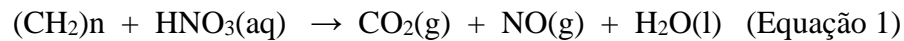
Após moagem, 0,3 g da amostra foram pesadas e diluídas com soluções de 10,0 mL de ácido nítrico 5 Mol L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio 12%, em seguida, levadas ao micro-ondas a 180°C por 50 minutos. Suas soluções foram inseridas no FAAS diretamente após a digestão sem nenhuma etapa de diluição. O procedimento foi realizado 8 vezes em triplicata em 3 dias diferentes.

**Preparo das curvas de calibração**

Ca e Mg: Em balões volumétricos de 100,0mL foram adicionadas alíquotas da Solução padrão de magnésio ou de cálcio 1,000mg/mL (padrão comercial para AA), 1000uL da solução de lantânio 10%, 5mL de solução nitro-perclórica diluída 10 vezes.

**3 RESULTADOS**

Os resultados obtidos foram mais próximos do valor desejado com a adição do peróxido de hidrogênio, que proporcionou o aumento da concentração de muitos nutrientes. O peróxido de hidrogênio fornece oxigênio que nas condições de aquecimento e pressurização dos tubos sob micro-ondas é capaz de regenerar o ácido nítrico decomposto em óxido nitroso (NO<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) (Bizzi et al, 2010). Isso aumenta a eficiência da decomposição, proporciona valores de brancos mais baixos, soluções menos agressivas aos instrumentos analíticos e ao analista e possibilita a minimização da quantidade de reagente utilizado e de resíduos da quantidade de reagente utilizado e de resíduos gerados (Bizzi et al, 2011). As reações da decomposição da matéria orgânica pelo ácido nítrico (Equação 1), com produção de NO, bem como a decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Equação 2) e a regeneração do HNO<sub>3</sub>, com NO indo a NO<sub>2</sub> (Equação 3), na presença de O<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> indo a HNO<sub>3</sub> e HNO<sub>2</sub> (Equação 4), este último se decompondo em NO<sub>2</sub> e NO (Equação 5) realimentando a Equação 3 estão representadas abaixo.



Os valores do método desenvolvido foram semelhantes aos obtidos pelo método tradicional para as amostras testadas, considerando uma faixa de variação de 10% da média do método tradicional (exceto amostra de referência que foi considerada uma faixa de 2 vezes o desvio-padrão). Nas Tabelas de 2 a 5 estão os resultados médios, desvios-padrão e faixa de desvio da média utilizada como critério para comparação do método tradicional com o método desenvolvido.

Tabela 2 – Amostra de referência interlaboratorial

Tabela 2 – Amostra de referência interlaboratorial							
	Analito	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
		(g/Kg)		(mg/Kg)			
Valores de Referência	Média	14,81	3,23	376,80	42,58	61,03	9,00
	Desvio-padrão	1,18	0,30	46,61	6,05	10,39	1,28
	Média - 2 X desvio-padrão	12,45	2,63	283,58	30,48	40,25	6,44
	Média + 2 X desvio-padrão	17,17	3,83	470,02	54,68	81,81	11,56
	% CV	10,55	9,29	12,37	14,21	17,02	14,22
Método Desenvolvido		12,65	3,34	350,9	34,34	50,9	6,76

Tabela 3 – Amostra de feijão-preto

Tabela 3 – Amostra de feijão-preto							
	Analito	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
		(g/Kg)		(mg/Kg)			
Método Tradicional	Média	1,31	1,69	109,8	27,77	15,04	9,09
	Desvio-padrão	0,11	0,05	16,21	3,55	1,18	0,70
	Média -10%	1,18	1,52	98,85	24,99	13,54	8,18
	Média +10%	1,44	1,86	120,81	30,54	16,55	10,00
Método Desenvolvido		1,18	1,76	103	25,07	15,14	9,13

Tabela 4 – Amostra de farelo de aveia

Tabela 4 – Amostra de farelo de aveia							
	Analito	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
		(g/Kg)		(mg/Kg)			
Método Tradicional	Média	0,54	1,91	58,34	36,59	62,90	4,86
	Desvio-padrão	0,05	0,08	10,98	4,17	3,83	0,49
	Média -10%	0,49	1,72	52,51	32,93	56,61	4,37
	Média +10%	0,60	2,10	64,17	40,25	69,19	5,34
Método Desenvolvido		0,57	2,09	58,85	34,88	63,38	4,89

Tabela 5 – Amostra de farelo de trigo

		Tabela 5 – Amostra de farelo de trigo					
Analito		Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
		(g/Kg)		(mg/Kg)			
Método Tradicional	Média	0,495	3,618	117,7	87,15	139,81	11,67
	Desvio-padrão	0,047	0,112	10,84	13,77	11,75	0,36
	Média -10%	0,45	3,26	105,93	78,44	125,83	10,50
	Média +10%	0,54	3,98	129,47	95,87	153,79	12,84
Método Desenvolvido		0,50	3,93	122,2	79,93	142,5	11,84

### 3.1 PARÂMETROS TESTADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

A validação em análise química é uma etapa muito importante para a garantia da qualidade e a confiabilidade dos resultados. Para a validação do método proposto, foram avaliados os seguintes parâmetros: Exatidão, Limite de Detecção do Equipamento (LDE), Limite de Detecção do Método (LDM), Limite de Quantificação (LQ), Limite de Linearidade (LL) e Seletividade, medidos após três repetições e dez leituras do branco..

Para avaliação da exatidão, utilizou-se uma amostra de referência para análise pelo método tradicional e pelo método proposto. Os resultados obtidos apresentaram desvios padrão mais baixos do que aqueles obtidos com a mesma amostra de referência em ensaio interlaboratorial.

Tabela 6 – Resultados de validação para os analitos

PARÂMETROS	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
Média (Abs.)	0,002	0,023	0,014	0,111	0,002	0,015
Desvio-Padrão (S)	0,001	0,001	0,005	0,002	0,002	0,001
Coefficiente de Variação CV (%)	44,20	2,85	33,75	1,37	9,24	3,75
LDE (Abs)	0,004	0,025	0,029	0,115	0,009	0,017
LDE (g kg <sup>-1</sup> )	0,020	0,001	0,012	0,0092	0,019	0,010
LDM (Abs)	0,009	0,029	0,063	0,126	0,025	0,021
LQ (g Kg <sup>-1</sup> )	0,03	0,003	0,033	0,013	0,017	0,033
LL (mg L <sup>-1</sup> )	4,00	1,30	10,00	1,60	6,00	6,00
LL (g Kg <sup>-1</sup> )	0,133	0,0433	0,333	0,053	0,200	0,200

Para avaliar a seletividade do método proposto, foram reproduzidas as curvas de calibração determinadas na etapa anterior, porém com adição de pequena quantidade de matriz de cada uma das amostras deste estudo. Nos gráficos das Figuras 01 a 06, pode ser visualizada a semelhança das curvas através da observação do posicionamento paralelo dos pontos.

Figura 1 – Teste de seletividade para Cálcio

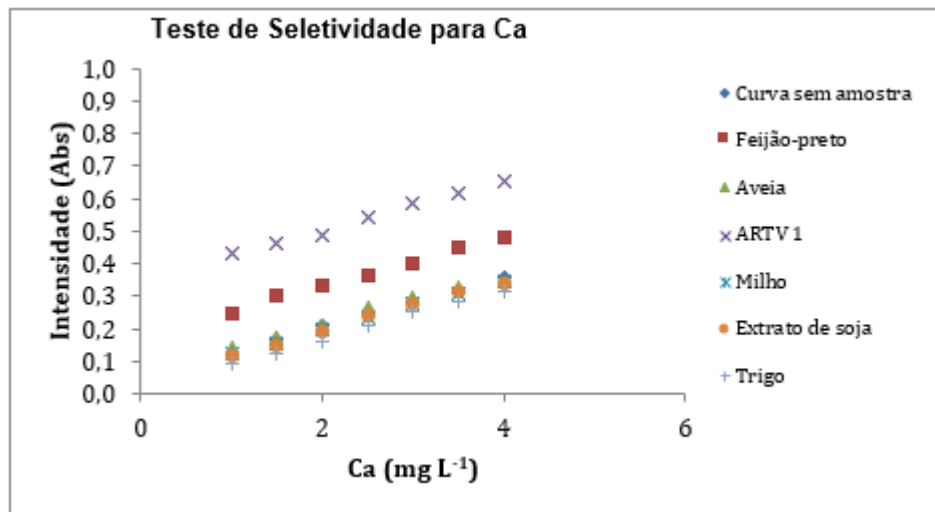


Figura 2 – Teste de seletividade para Magnésio

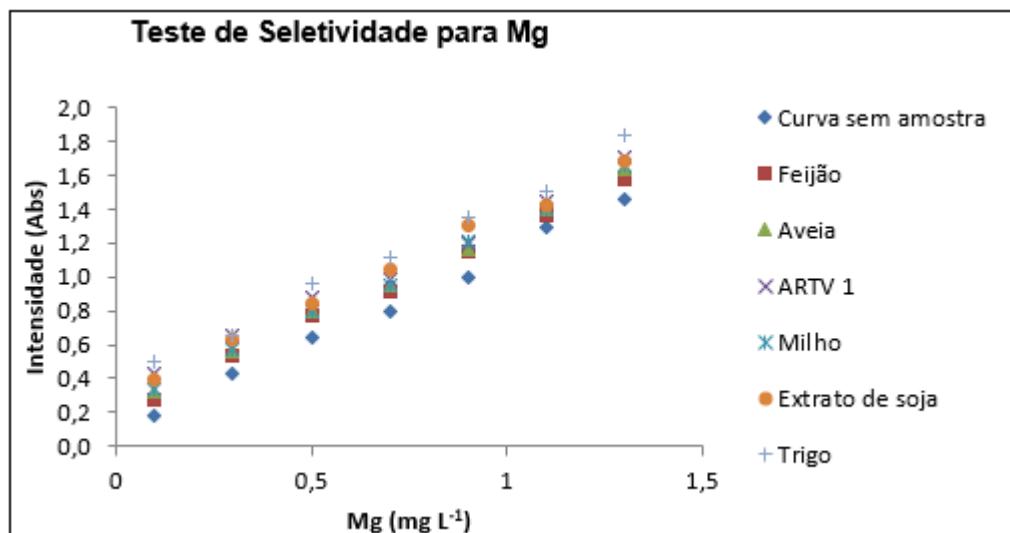


Figura 3 – Teste de seletividade para Ferro

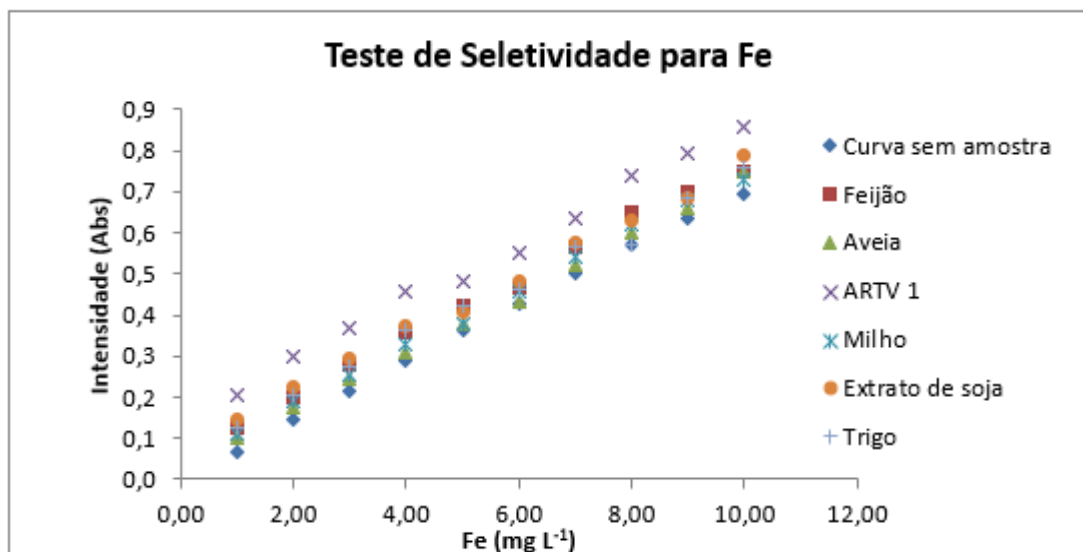




Figura 4 - Teste de seletividade para Zn

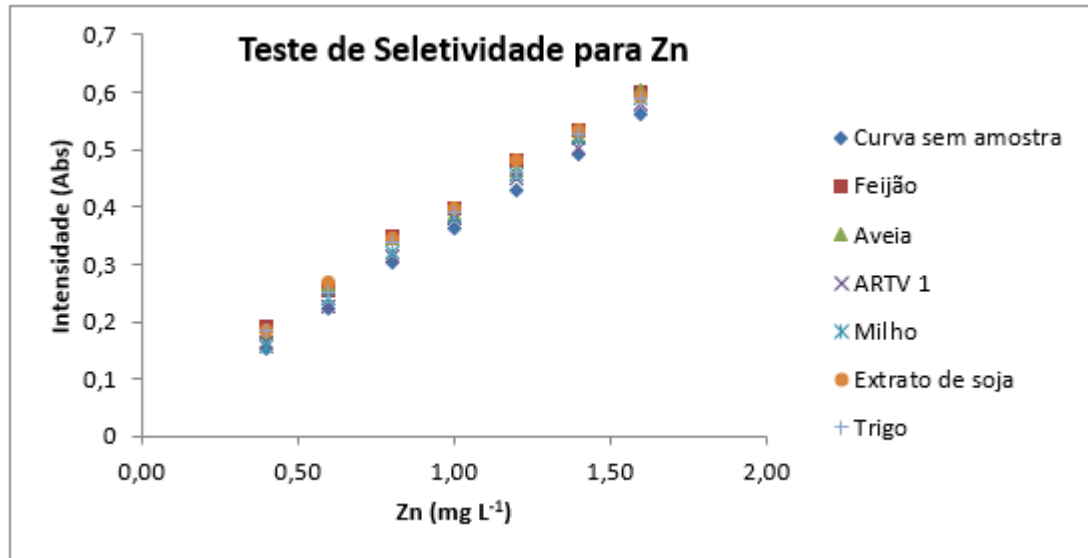


Figura 5 – Teste de seletividade para Manganês

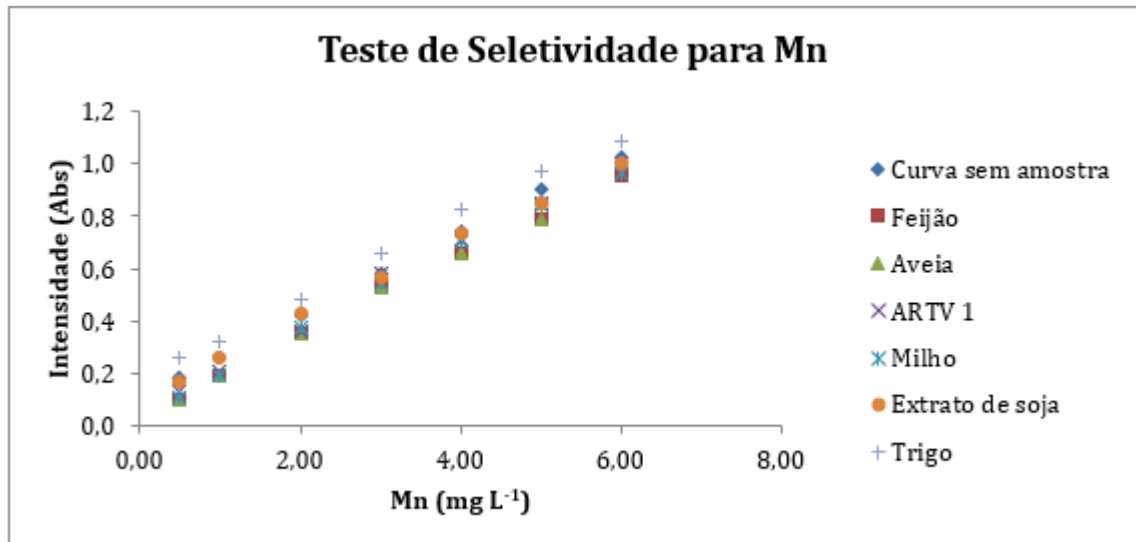
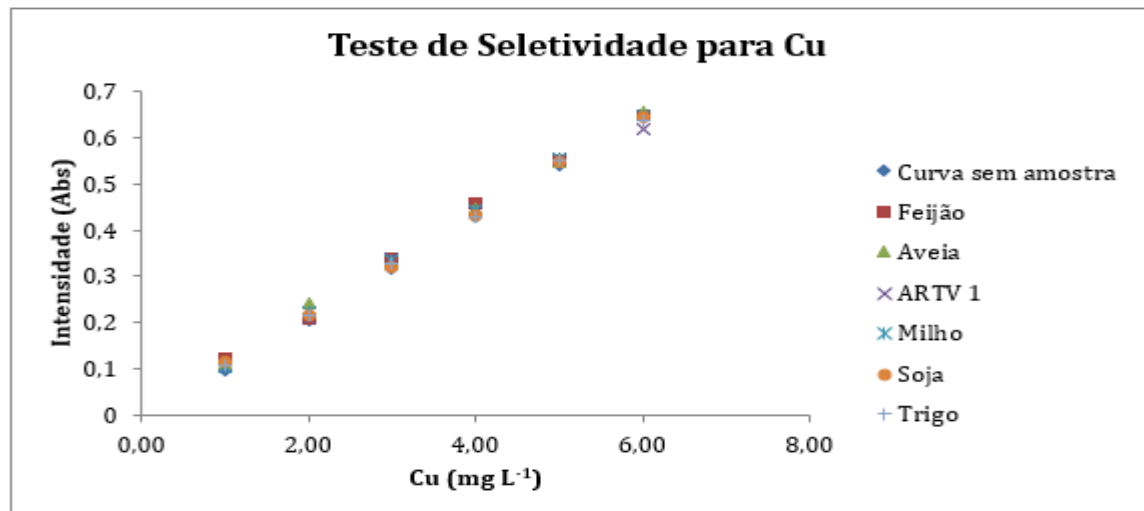


Figura 6 – Teste de seletividade para Cobre



#### 4 CONCLUSÕES

O método desenvolvido e proposto neste trabalho para a digestão das amostras de tecido vegetal apresentou vantagens frente ao método tradicional, consumindo menor volume de reagentes; além de oferecer melhores condições para digestão de 300 mg de tecido vegetal em forno de micro-ondas, sem geração de vapor para o ambiente e todo o risco e insalubridade inerentes ao seu uso como queimaduras e explosão. Além disso, o uso do ácido nítrico diluído a  $5 \text{ mol L}^{-1}$  minimiza os riscos do trabalho com o ácido na sua forma mais concentrada e poupa também a instrumentação dos danos causados pelo uso de ácidos concentrados. É mais econômico por não exigir uso de sistema de exaustão e tratamento de gases, além de gerar menos resíduo. O método foi validado com amostra de referência de ensaio de proficiência interlaboratorial, assegurando a consistência do processo de validação. Foram obtidos resultados satisfatórios para todos os principais parâmetros validados testados (Linearidade, LDE, LDM, LQ e LL e Seletividade) para as amostras testadas, garantindo a sua aplicabilidade ao preparo de diversos tipos de amostras de tecido vegetal e análise dos macro e micronutrientes foi alcançado, de forma eficiente, com economia, qualidade e praticidade, eliminação de riscos ambientais e de insalubridade.

#### REFERÊNCIAS

BIZZI, C. A., BARIN, J. S., MÜLLER, E. I., SCHMIDT, L., NÓBREGA, J. A., & FLORES, E. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. *Talanta*, 83, pp. 1324–1328, 2011.

BIZZI, C. A., FLORES, É. M., PICOLOTO, R. S., BARIN, J. S., & NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Anal. Methods*, 2, pp. 734–738, 2010.

KEITH, L.H., GRON, L.U., YOUNG, J. L. Green analytical methodologies. **Chem. Rev.** 107 (6), p. 2695–2708, 2007.

KIRKBY, E.A., ROMHELD, V. Micronutrientes na Fisiologia de Plantas: Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações Agronômicas**, 118, p. 1-24, 2007.

MERCHANT, S.S. The Elements of Plant Micronutrients. **Plant Physiology**, 154, p. 512–515, 2010.

SILVA, S.G., OLIVEIRA, P.V., ROCHA, F.R.. A Green Analytical Procedure for Determination of Copper and Iron in Plant Materials after Cloud Point Extraction. **J.Braz. Chem. Soc.**, 2, 234-239, 2010.

SOIL AND PLANT ANALYSIS COUNCIL, INC. Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. Y. P. Kalra, Ed., 1998;

SOUZA, RM., MELIANDE, AS., SILVEIRA, CLP. Determination of trace elements in crude oil by ICP-OES using ultrasound-assisted acid extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 21, p. 1345-1350, 2006.

TOBISZEWSKI, M., MECHLINSKA, A., NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry theory and practice. **Chemical Society Reviews**, 39 (8), p. 2869-78, 2010.