

Notas Científicas

Microondas como alternativa na abertura de amostras para dosagem de silício em tecido foliar de espécies florestais por determinação colorimétrica

Claudia Mara Pereira⁽¹⁾, Fabricio Augusto Hansel⁽¹⁾, Maria Izabel Radomski⁽²⁾ e Maisa Gottardo Verdeckin⁽³⁾

⁽¹⁾ Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo-PR. E-mail: claudiam@cnpf.embrapa.br, hansel@cnpf.embrapa.br,

⁽²⁾ Instituto Agronômico do Paraná, Avenida Presidente Kennedy, s/no, CEP 84001-970, Curitiba-PR. E-mail: izabelis@iapar.br, ⁽³⁾ Universidade Federal do Paraná - UFPR, Avenida Prefeito Lothário Meissner, 3400, CEP 80210-700, Curitiba-PR. E-mail: maisagottardo@yahoo.com.br

Resumo - Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso de digestão em microondas na determinação colorimétrica de silício em amostras de tecido vegetal de espécies florestais. Nos testes realizados, o coeficiente de correlação (r) foi de 0,998 para a faixa de concentração de 0,4 até 7 mg.g⁻¹. As recuperações realizadas, a partir de testes de fortificação em celulose, foram superiores a 90 % para duas concentrações testadas (2 e 4 mg.g⁻¹), so coeficiente de variação foi igual a 4,2 % e 7,0 % para a espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) e eucalipto (*Eucalyptus benthamii*), respectivamente. A digestão por microondas foi comparada com a digestão por autoclave em teste interlaboratorial, sendo que os erros relativos apresentaram-se menores que 17 % para todas as amostras testadas. Considerando os resultados obtidos, a abertura das amostras de tecido foliar de espécies florestais em microondas apresenta-se como uma alternativa, dentro dos limites testados, na dosagem de silício pelo método colorimétrico, com leitura realizada no comprimento de onda de 410 nm.

Termos para indexação: Folhas, digestão, colorimetria, *Eucalyptus benthamii*, *Maytenus ilicifolia*, silício.

Microwave as an alternative to sample preparation in the foliar tissue silicon analysis of wood species for colorimetric determination

Abstract - The aim of this work was to test the viability of microwave digestion for the colorimetric determination of silicon in foliar tissues of wood species. In the test, the correlation coefficient was 0.998 in the concentration range of 0.4 to 7 mg.g⁻¹. Spiked cellulose samples were used and the recovery was high than 90 % in two tested concentrations (2 e 4 mg.g⁻¹). The obtained coefficients of variation were equal to 4.2 % and 7.0 % for espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) and eucalipto (*Eucalyptus benthamii*), respectively. The microwave-induced digestion was compared to autoclave-induced digestion by interlaboratorial test, with relative errors smaller than 17 % in all tested samples (n=10). Based on these results, the microwave digestion of foliar tissues samples of wood species showed to be an alternative to determination of silicon by colorimetric method performed at a wavelength of 410 nm.

Index terms: Leaves, digestion, colorimetry, *Eucalyptus benthamii*, *Maytenus ilicifolia*, silicon.

O silício (Si) é um dos elementos mais abundantes encontrados na crosta terrestre, mas a sua forma de distribuição natural não o classifica como um nutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, principalmente devido ao baixo grau de intemperismo nos solos, o que diminui a disponibilidade do mesmo às plantas. Entretanto, a adubação com Si tem mostrado excelentes resultados em culturas como arroz e cana de açúcar,

principalmente com relação à resistência da planta a pragas e doenças, à facilitação da capacidade fotossintética (i.e. as folhas ficam mais eretas e a incidência da luz é maior), à tolerância à falta de água e na atenuação do efeito tóxico de Fe e Mn (MALAVOLTA, 1980; MARSCHNER, 1986; KORNDORFER; DATNOFF, 1995; KORNDORFER et al., 1999).

Os efeitos da adubação com Si em espécies arbóreas também têm sido relatados. Emadian e Newton (1989) observaram maior desenvolvimento de mudas de *Pinus taeda* que receberam aplicação de Si e adubação em relação às plantas que receberam apenas adubação convencional. Bradbury e Ahmad (1990) verificaram que a aplicação de Si, em solos salinos, aumenta a produção de biomassa de *Prosopis juliflorai*, o que pode estar relacionado ao papel desse elemento na elasticidade das paredes primárias das células. Carvalho et al. (2000; 2003) observaram ganhos em fósforo e incrementos na produção de matéria seca da parte aérea, em plantas de *Eucalyptus grandis* cultivadas em Cambissolo, o qual recebeu aplicação de Si, após adubação fosfatada. Santana et al. (2007) verificaram que a adubação com silicato provocou menores danos por geada e menor infestação de insetos em plantas de *E. grandis*. Em função da importância que o Si vem assumindo na nutrição das plantas, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam o diagnóstico dos teores do elemento tanto no solo como em tecido vegetal.

As metodologias normalmente utilizadas para a determinação de Si em plantas incluem métodos gravimétricos (YOSHIDA et al., 1976), fusão em alta temperatura e subsequente colorimetria (KILMER, 1965), e solubilização da planta com ácido fluorídrico seguida por análise em espectrofotômetro de absorção atômica ou método colorimétrico (NOVOZAMSKY et al., 1984; VORM, 1987). Dentre as metodologias utilizadas, o método colorimétrico é comumente aplicado. Entretanto, com o passar dos anos, modificações foram realizadas principalmente com relação à abertura das amostras e diminuição de interferências químicas (JANKOWIAK; LEVIER, 1971; ELLIOT; SNYDER, 1991). Por exemplo, Elliot e Snyder (1991) compararam as aberturas de fusão com a digestão alcalina em autoclave, no qual a abertura em autoclave mostrou-se mais rápida, podendo ser utilizada em análises de rotina, com baixo custo e necessitando de menor quantidade de reagentes perigosos.

A abertura de amostras em forno microondas vem sendo cada vez mais utilizada devido às vantagens frente aos métodos de digestão tradicionais, pois não há perda do analito por volatilização, permitindo menor consumo de reagentes e menor tempo de digestão, com mínima contaminação externa e sem despreendimento de gases e vapores tóxicos. O uso de microondas nos processos

de digestão de amostras, inclusive para a decomposição de silicatos, tem despertado grande interesse (BOAVENTURA; RIBEIRO, 1996).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a abertura de amostras de tecido foliar de espécies florestais por microondas com o intuito de se dosar Si pelo método colorimétrico com leitura realizada no comprimento de onda de 410 nm.

Para o desenvolvimento do trabalho, utilizaram-se folhas de eucalipto (*Eucalyptus benthamii*) e espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), e ainda uma amostra de celulose solúvel, fornecida pela Empresa Bahia Pulp. Todas as amostras foram previamente secas em estufa a 60 °C e moídas em moinho tipo Willey (modelo MA680) com tela de 20 mesh. Os reagentes utilizados foram de grau analítico: peróxido de hidrogênio (Vetec), hidróxido de sódio (Quimex), ácido oxálico (Reagen) e heptamolibdato de amônio tetraidratado (Merck). No preparo das soluções foram utilizados somente frascos de polipropileno. As amostras foram digeridas em forno de microondas Milestone MLS 1200, utilizando frascos de Teflon devidamente vedados e tiveram suas concentrações determinadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 20, com comprimento de onda de 410 nm, o qual corresponde à leitura da absorção máxima da cor amarela desenvolvida durante a reação.

Nas amostras foram adicionados 3 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (3:1 m:v) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (30 %). A mistura permaneceu em repouso por 1 h para permitir a eliminação do excesso de gás formado. As amostras foram então digeridas em microondas, de acordo com a seguinte programação: aquecimento por 1 h à temperatura de 123 °C, potência de 250 W e pressão de 2 Bar. Em seguida, o produto da digestão foi diluído a 50 mL em um balão volumétrico. Em uma alíquota de 5 mL da solução resultante foram adicionados 15 mL de água destilada, 2 mL de solução de ácido clorídrico (50 %), 3 mL de solução aquosa de heptamolibdato de amônio tetraidratado (10 % m/v) e 2 mL de solução aquosa de ácido oxálico (7,5 % m.v⁻¹). Após o desenvolvimento da coloração amarela, as leituras das absorbâncias foram realizadas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm. As concentrações de Si foram determinadas utilizando uma curva de calibração, preparada a partir de diluição da solução padrão Titrisol[®], contendo 1.000 mg.L⁻¹ de Si, nas concentrações de 0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹.

Realizou-se um estudo comparativo de digestão entre cinco quantidades de amostras de tecido foliar de eucalipto (25, 50, 75, 100 e 150 mg), visando à otimização da quantidade de amostra a ser digerida. A precisão do método foi estudada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), sendo a recuperação do Si verificada em duas concentrações (2 e 4 mg g⁻¹) a partir da fortificação em uma amostra de celulose livre de Si. Quanto à linearidade do método, esta foi averiguada a partir da diluição de amostras digeridas. Os testes foram realizados em triplicata, exceções estão mencionadas no texto. Ainda testou-se a “exatidão” do procedimento pela comparação entre dez amostras de tecido foliar de espinheira santa, analisadas pelo procedimento proposto e por outro procedimento similar realizado em um laboratório externo, o qual efetuou digestão em autoclave e a mesma determinação colorimétrica – teste interlaboratorial (ELLIOT; SNYDER, 1991).

A otimização da melhor quantidade da amostra foi realizada comparativamente, efetuando-se a digestão em microondas de cinco quantidades diferentes de amostras de tecido foliar de eucalipto, e posterior determinação colorimétrica das mesmas, mantendo-se condições idênticas para todas as amostras testadas. A Figura 1A mostra os valores obtidos no teste. As quantidades de 50, 75 e 100 mg de eucalipto apresentaram teores de Si semelhantes entre si ($p < 0,05$), e parecidos com o valor médio obtido (6,85 mg.g⁻¹), considerando todas as

amostras. Visualmente, a solução resultante da abertura destas quantidades apresentou-se límpida, diferente das amostras com 25 e 150 mg. Na abertura com 25 mg, observou-se que parte do material encontrava-se aderida às paredes laterais do frasco de microondas, o que não propiciou um contato efetivo com a solução de abertura. Isto explicaria o baixo valor encontrado de $2,81 \pm 1,11$ mg.g⁻¹ com relação aos valores obtidos para amostras de 50, 75 e 100 mg (Figura 1A), pois nem toda a amostra foi digerida durante o processo. Quando do uso de 150 mg de amostra, as soluções obtidas após as digestões apresentavam-se com aspecto leitoso, indicando a ineficiência na abertura, sendo os teores de Si encontrados em média igual a $10,62 \pm 1,87$ mg.g⁻¹, visivelmente superior às médias obtidas com 50, 75 e 100 mg de amostra (Figura 1A). Isto ocorreu provavelmente devido à turbidez na solução, a qual interferiu na leitura, indicando o teor elevado de Si na quantidade de 150 mg de amostra (Figura 1A). Dentre os valores considerados adequados (50, 100 e 150 mg), a quantidade de 50 mg apresentou o maior CV (13 %). Para as quantidades de 75 e 100 mg, os valores de CV foram de 5 % e 7 %, respectivamente. Elliot e Snyder (1991) utilizaram o valor de 100 mg em seu estudo, sendo que os valores de CV foram semelhantes para as quantidades de 50 e 100 mg ($p < 0,05$). O valor de 100 mg foi adotado para os demais ensaios.

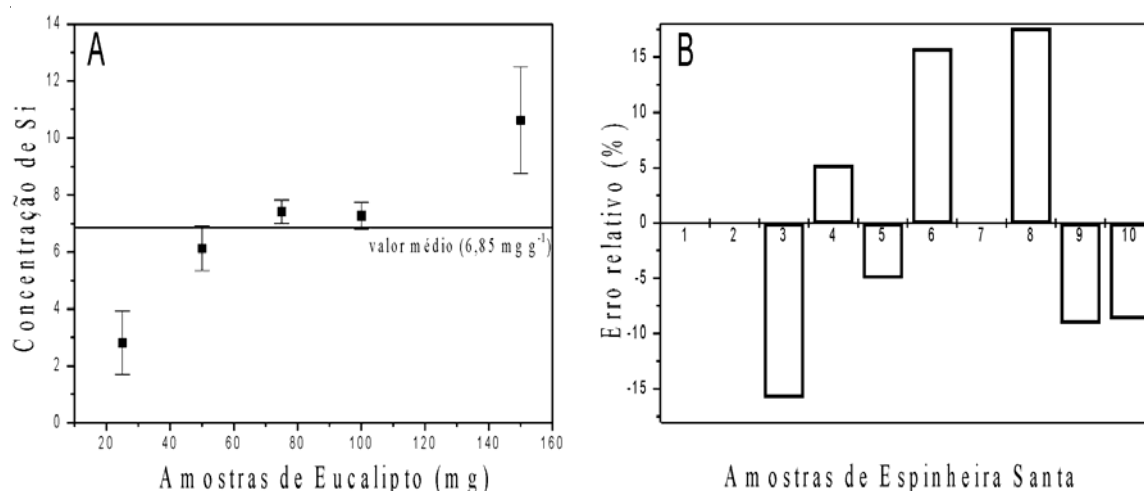


Figura 1. Otimização da quantidade de amostra (A) e erro relativo interlaboratorial para dez amostras de espinheira santa (B).

A precisão do procedimento em microondas também foi testada com amostras de tecido foliar de espinheira santa (100 mg, n = 6), sendo o CV produzido menor que o valor encontrado para folhas de eucalipto (Tabela 1). Isto mostra que o tipo de amostra influencia a dispersão dos resultados. No caso do tecido foliar de eucalipto, os resultados fornecidos foram menos precisos, mas ainda com um valor aceitável, inferior a 10 %. Esta diferença pode estar associada à composição do tecido foliar das duas espécies, uma vez que os teores de lignina em eucaliptos, por exemplo, são normalmente o dobro dos encontrados nos tecidos foliares de espinheira santa (RADOMSKI, 2000; MAGATON et al., 2002). Valores de CV para análises de Si em tecido foliar de espinheira por diferentes métodos espectrométricos foram encontrados na faixa entre 3 % a 18 % (VAN DYCK et al., 2000). O CV apresentou-se maior do que aqueles fornecidos para amostras de caule de arroz abertas em autoclave e fusão alcalina com NaOH 2,3 % e 3,6 %, respectivamente, utilizando método de leitura colorimétrico (ELLIOT; SNYDER, 1991).

Tabela 1. Detalhes analíticos para a dosagem de Si em tecido foliar de espécies florestais por método colorimétrico e abertura das amostras em microondas.

Parâmetro analítico	Valor
CV ^a espinheira santa	4,2 %
CV eucalipto	7,0 %
Recuperação ^b de 2 mg g ⁻¹	99 %
Recuperação de 4 mg g ⁻¹	91 %
Faixa de leitura ^c	0,4 até 7 mg g ⁻¹ (r = 0,998)

A faixa de leitura e a recuperação também estão listadas na Tabela 1. A faixa de leitura foi estudada a partir da análise de 12 amostras, sendo estas divididas em quatro grupos com três amostras. Em cada grupo foi coletada uma alíquota diferente com valores correspondentes a 0,63; 1,25; 2,5; e 5 mL. Após a diluição ao volume padrão utilizado, realizaram-se as leituras. A faixa de concentração ficou entre 0,4 a 7,0 mg.g⁻¹, faixa comum encontrada em tecido foliar de espécies florestais, e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,998. As recuperações realizadas a partir dos testes de fortificação foram superiores a 90 % para as duas concentrações testadas (2 e 4 mg.g⁻¹) (Tabela 1). Dez

amostras de branco foram testadas, e em nenhuma delas foi encontrado valores significativos de Si (40 μ.g⁻¹), indicando que não há interferência na análise desse elemento por essa metodologia.

A digestão por microondas foi comparada com a digestão por autoclave em teste interlaboratorial através da análise de dez amostras de tecido foliar de espinheira santa. A Figura 1B apresenta os valores dos erros relativos para cada amostra. Os resultados fornecidos pelo laboratório externo foram considerados como reais, pois o procedimento já foi publicado por Elliot e Snyder (1991). Erros maiores que 15 % foram observados somente de três amostras, sendo o maior erro relativo de 17 %, para a amostra 8. Três amostras não apresentaram nenhum erro, e em quatro delas foram observados erros relativos abaixo de 10 %.

Considerando os resultados obtidos, a abertura via microondas de amostra de tecido foliar de espécies florestais apresenta-se como uma alternativa, dentro dos limites testados, na dosagem de silício pelo método colorimétrico com leitura no comprimento de onda de 410 nm. Possuindo como principais vantagens a rapidez na digestão e o fato de se poder evitar possíveis contaminações, por se tratar de uma digestão em sistema fechado.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro destinado às análises de laboratório, e à empresa Bahia Pulp, pelo fornecimento da amostra de celulose.

Referências

- BOAVENTURA, G. R.; RIBEIRO, R. L. V. Decomposição de silicatos usando forno de microondas. **Geochimica Brasiliensis**, v. 10, p. 217-224, 1996.
- BRADBURY, M.; AHMAD, R. The effect of silicon on the growth of *Prosopis juliflora* in saline soil. **Plant and Soil**, v. 125, p. 71-74, 1990.
- CARVALHO, R.; FURTINI NETO, A. E.; CURI, N.; FERNANDES, L. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. C. Dessorção de fósforo por silício em solos cultivados com eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 69-74, 2000.
- CARVALHO, R.; FURTINI NETO, A. E.; CURI, N.; FERNANDES, L. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. C. Absorção e translocação de silício em mudas de eucalipto cultivadas em latossolo e cambissolo. **Ciência Agrotécnica**, v. 27, p. 491-500, 2003.

- ELLIOT, C. L.; SNYDER, G. H. Autoclave-Induced Digestion for the Colorimetric Determination of Silicon in rice straw. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, p. 1118-1119, 1991.
- EMADIAN, S. F.; NEWTON, R. J. Growth enhancement of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedlings by silicon. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 98-103, 1989.
- JANKOWIAK, M. E.; LEVIER, R. R. Elimination of phosphorus interference in the colorimetric determination of silicon in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 462-472, 1971.
- KILMER, V. J. Silicon. In: BLACK, C. A. (ed.) **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v. 2, p. 959-962. (Agronomy, 9).
- KORNDORFER, G. H.; COELHO, N. M.; SNYDER, G. H.; MIZUTANI, C. T. Avaliação de métodos de extração de silício em solos cultivados com arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 23, p. 101-106, 1999.
- KORNDORFER, G. H.; DATNOFF, L. E. Adubação com silício: uma alternativa no controle de doenças de cana-de-açúcar e do arroz. **Informações Agronômicas**. v. 70, p. 1-5, 1995.
- MAGATON, A. B.; OLIVEIRA, R.; LOPES, O. R.; MILAGRES, F. R.; PILÓ-VELOSO, D.; COLODETTE, J. L. **Composição química da madeira de espécies de eucalipo**: resumo em congresso do ano de 2002. Disponível em: <https://sec.sbg.org.br/cd29ra/resumos/T1908-1.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2008.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba, 1980. Editora Agronômica, Ceres, 251 p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego, 1996. Academic Press, 674 p.
- NOVOZAMSKY, I.; VANECK, R.; HOUBA, V. J. G. A rapid determination of silicon in plant material. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 15, p. 205-211, 1984.
- RADOMSKI, M. I. **Teores foliares de silício, taninos e lignina, em *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss (espinheira santa), em função de variáveis ambientais e genéticas**. 2000. 104f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- SANTANA, D. L. de; THOMAZ, D. T.; RADOMSKI M. I.; DEDECEK, R. A.; LINHAR, C. de A.; CAMARGO, J. M. M. Efeito da aplicação de silício na melhoria da tolerância do *Eucalyptus grandis* à ação da geada e ataque de insetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SILÍCIO NA AGRICULTURA, 4., 2007, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, 2007. p. 123-126.
- VAN DYCK, K.; ROBBERECHT, H.; VAN CAUWENBERGH, R.; DEELSTRA, H.; ARNAUD, J.; WILLEMYS, L.; BENIJS, F.; CENTENO, J. A.; TAYLOR, H.; SOARES, M. E.; BASTOS, M. L.; FERREIRA, M. A.; D'HAESE, P. C.; LAMBERTS, L. V.; HOENIG, M.; KNAPP, G.; LUGOWSKI, S. J.; MOENS, L.; RIONDATO, J.; VAN GRICKEN, R.; CLAES, M.; VERHEYEN, R.; CLEMENT, L.; UYTTERHOEVEN, M. Spectrometric determination of silicon in food and biological samples: an interlaboratory trial. **Journal of analytical atomic spectroscopy**, v. 15, p. 735-174, 2000.
- VORM, P. D. J. van der. Dry ashing of plant material and dissolution of the ash in HF for the colorimetric determination of silicon. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 18, p. 1181-1189, 1987.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice**. Los Banos, Laguna, 1976. International Rice Research Institute, 3th edition, 61 p.

Recebido em 27 de março de 2007 e aprovado em 8 de julho de 2008