



## **EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE NUTRIENTES DE TECIDO VEGETAL.**

**D'ANGELO TRINDADE, Guilherme;** BELOTI, Igor Forigo<sup>2</sup>; ALVES, Jessica Mieke Ota<sup>3</sup>; SANTOS, Wedisson Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa do curso de Graduação em Agronomia; <sup>2</sup>Técnico de Laboratório; <sup>3</sup>Técnica de Laboratório; <sup>4</sup>Professor Adjunto no Instituto de Ciências Agrárias, UFU, Uberlândia, MG, E-mail: guilhermedtrindade14@gmail.com

### **RESUMO**

A quantificação do teor foliar de nutrientes possibilita o diagnóstico do estado nutricional das plantas em termos de deficiências, suficiências, excessos e equilíbrios de nutrientes, auxiliando no manejo da adubação das culturas. Assim, é essencial a determinação, com elevada exatidão, dos teores de nutrientes de folhas de referências das culturas para diagnósticos mais acurados. Como há grande diversidade de métodos analíticos para determinar teores totais de nutrientes em tecidos vegetais e poucos trabalhos que contrastem suas eficiências propõe-se com este resumo apresentar os principais métodos, apontando suas potencialidades e limitações e propor um projeto de pesquisa cujo objetivo é avaliar a acurácia de diferentes métodos de mineralização de tecidos vegetais, que são amplamente utilizados na pesquisa e em rotinas de laboratórios. Os métodos mais utilizados são digestão nitro-perclórica, que é realizada em bloco de digestor, que apresenta como vantagens a solubilização quase que total da amostra, porém possui algumas desvantagens como: emissão de vapores tóxicos, tempo, já que é um processo demorado e alta probabilidade de contaminação. O outro método muito utilizado é a calcinação, que é um método realizado em forno mufla, que é mais rápido que a digestão úmida nitro-perclórica, porém exige atenção para que temperaturas muito elevadas não sejam atingidas, nesse método também pode ocorrer contaminação por partículas do revestimento interno do forno. Folhas de milho e soja serão utilizadas para quantificação dos teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu, Mn e Fe. Serão utilizados métodos baseados em digestão úmida em sistema aberto (água régia\_1 e nítrico-perclórica\_4) ou calcinação (2). O delineamento experimental será considerado como DIC, com quatro repetições. Os resultados serão submetidos a análise de variância, sendo os métodos avaliados quanto as seguintes variáveis: equivalências (teste Skott-Knott) capacidade de extração, exatidão (aproximação dos valores de referência) e precisão (CV,  $\sigma$ ,  $\sigma/\sqrt{n}$ ). Portanto, pretende-se eleger uma metodologia mais acurada (exatidão\*precisão) de extração de nutrientes minerais de tecidos vegetais.

**Palavras-chave:** análise foliar, soja, milho, metodologias.

### **1. INTRODUÇÃO**

A quantificação do teor foliar de nutrientes minerais em órgãos vegetais visa o diagnóstico nutricional da cultura quanto a deficiência, suficiência ou excessos do nutriente e equilíbrios nutricionais, possibilitando auxiliar no manejo nutricional das culturas, juntamente com a análise de solo (MALAVOLTA et al., 1997). De fato, há estreita relação entre os teores foliares de nutrientes com suas disponibilidades no solo, portanto busca-se métodos analíticos capazes de determinar com elevada exatidão tais teores (MARTIN PREVEL et al., 1984).

Os métodos mais antigos de quantificação de teores de nutrientes em tecidos vegetais são baseados em calcinação, os quais envolvem a completa carbonização da matéria orgânica, seguido da dissolução ácida do material remanescente, as cinzas. Diante de algumas

desvantagens dos métodos de carbonização, métodos baseados em digestão úmida do material vegetal são mais abundantes. Como princípio geral, esses métodos apresentam como componente central a presença de um ou mais agentes oxidantes químicos do material orgânico. Entretanto, a eficiência desses métodos pode variar a depender do agente oxidante, de relações volume/massa com a amostra e condições de digestão, que em geral envolvem aquecimento (BERNARDI; OKA; SOUZA, 2010).

O uso de variados métodos pode aumentar o erro analítico entre laboratórios afetando a confiabilidade das análises, o que, em última instância, pode refletir negativamente na exatidão do diagnóstico nutricional, implicando em equívocos no manejo nutricional das culturas. Propõe-se aqui apresentar os princípios de extração de nutrientes minerais por diferentes métodos, apresentando suas vantagens e desvantagens, visando auxiliar técnicos na escolha das melhores opções. A escassez de trabalhos que apresentem os contrastes da eficiência dos métodos de análise em tecidos vegetais, justificam a realização desta pesquisa. Portanto, o objetivo do trabalho é apresentar os principais métodos de extração de nutrientes de tecidos vegetais, apontando suas potencialidades e limitações.

## 2. METODOLOGIA

O experimento será realizado no Laboratório Micellium, em Barretos.

O ensaio seguirá o esquema fatorial 2 x 8, sendo duas culturas (milho e soja) e oito métodos de mineralização de tecido vegetal. Para tanto, amostras de folhas de milho ou soja serão secadas em estufa com ventilação forçada de ar (65 °C) até estabilidade de massa, sendo em seguida moidas em moinho tipo Wiley com peneira de malha 20 mesh.

Amostras do material vegetal de massa variável serão submetidas aos tratamentos de mineralização, conforme descrito no Quadro 1.

**Quadro 1.** Descrição das marchas analíticas dos métodos de mineralização (tratamentos).

Método	Solução Extratora	Marcha de extração	Referência
Digestão seca em cadinhos de porcelana	25 mL HNO <sub>3</sub>	Pesagem de 0,5 g da amostra em cadinhos previamente tarados. Leva os cadinhos a mufla em temperatura gradativamente elevada pelo próprio aparelho a 550°C de 2 a 4 h. Após resfriamento da amostra em dessecador, adiciona-se 25 mL de HNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> .	Carmo et al. (2000)
Digestão seca em cadinhos de porcelana	5 mL HNO <sub>3</sub>	Pesagem de 0,2 g do material vegetal diretamente em cadinhos de porcelana. Em seguida, os cadinhos são levados à mufla ainda frios em temperatura elevada a 550° C, onde permanecem por 2 h. Após esse tempo adicionam-se 5 mL de HNO <sub>3</sub> P.A. concentrado e o extrato obtido é diluído em 20 mL com água bidestilada e filtrado com membrana celulósica.	AOAC (1982)
Digestão seca em cadinhos de porcelana	mL HNO <sub>3</sub>	Pesagem de 0,5 g da amostra em cadinhos previamente tarados. Em seguida, os cadinhos frios são levados à mufla, onde a temperatura é gradativa elevada a 550 °C, permanecendo por 3 h nesta temperatura. Após esse tempo, a cinza é dissolvida em 25 mL de HNO <sub>3</sub> 1 mol.L <sup>-1</sup> e o extrato obtido é filtrado com membrana celulósica.	Silva (2009)
Água régia _3:1	3:1, v:v, HCl: HNO <sub>3</sub>	Pesagem de 0,2 g de material vegetal em tubo de digestão. Adiciona-se 6 mL de água régia a frio, ficando em pré digestão por 16 h. Em seguida, inicia-se a digestão em bloco com elevação gradual de temperatura até 180 °C e até restar cerca de 1 mL de ácido. As amostras são resfriadas e	McGrath e Cunliffe (1985)

adiciona-se ao extrato 10 mL de água bidestilada e filtra-se com membrana de filtração e transfere-se para tubo Falcon de 55 mL.

Nítrico-perclórico	2:1, v:v, HNO <sub>3</sub> :HClO <sub>4</sub>	Pesagem de 0,5 g de material moído em tubo de digestão. Adiciona-se 4 mL de ácido nítrico, ficando em repouso por 12 horas. Na sequência, leva-se ao aquecimento até 120 °C. Na sequência adiciona-se 2mL de ácido perclórico e eleva-se a temperatura até 180 °C. Deixa-se esfriar e adiciona-se 25 mL água ultra pura.	Embrapa (2000)
Nítrico-perclórico	3:1, v:v, HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub>	Pesagem de 0,2 g de material em tubo de digestão. Adiciona-se 6 mL de ácido nítrico, ficando em repouso por 16h. Na sequência, leva-se ao aquecimento até 140°C em bloco digestor até restar 1 mL de ácido. Retira-se os tubos e deixa esfriar. Adiciona-se 2 mL de ácido perclórico e aquece até 190°C por mais 2 horas. As amostras são retiradas com aproximadamente 2mL e resfriadas, em seguida, adiciona-se água bidestilada e filtra-se com membrana de filtração.	Tedesco et al. (1995)
Nítrico-Perclórico	4:1, v:v, HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub>	Pesagem de 0,5 g de material. Adição de 6 mL da mistura ácido nítrico e perclórico na relação 4:1 v/v. Na sequência, leva-se ao aquecimento em chapa aquecedora de 80 °C até 200 °C. Por fim, completa-se o volume com água deionizada. Agita-se e filtra em papel filtro quantitativo.	Sarruge e Haag (1974)
Nítrico-perclórico	7:1, v:v, HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub>	Pesa-se 0,4 g de material. Adiciona-se 7 mL de ácido nítrico P.A. a 25°, ficando em repouso por 16 h. Na sequência, leva-se ao aquecimento em bloco digestor de 80° a 100 °C por 3h e 30min. Adiciona-se 1mL de ácido perclórico P.A. e aumenta-se a temperatura até 200 °C. Por último adiciona-se 20mL de água deionizada.	Zasousk e Burau (1977)

Os resultados dos teores de nutrientes serão inicialmente submetidos a teste de normalidade e de homogeneidade. Em seguida, atendendo a estas pressuposições, os dados serão submetidos a análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste Skott-Knott (0,05). Medidas de dispersão dos dados, como CV, desvio padrão ou erro padrão serão utilizadas para inferências sobre a precisão dos métodos. Adicionalmente a exatidão dos métodos será calculada pela diferença entre teores de referência com aqueles obtidos pelos diferentes métodos.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Princípio-** O conhecimento dos teores de nutrientes minerais em folhas de referência das culturas possibilita a identificação de deficiências, excessos e desequilíbrios nutricionais, já que a composição química da planta reflete de forma integrada as condições edafoclimáticas as quais interage, incluindo a disponibilidade de nutrientes no solo (MALAVOLTA et al., 1997).

A análise do tecido foliar é a prática mais usual para a diagnose do estado nutricional das plantas, já que a folha é órgão chave do metabolismo vegetal, sendo sensível à disponibilidade de nutrientes do solo, que afeta diretamente à produtividade vegetal (FERREIRA, 2014). Portanto, a análise foliar trata-se de uma ferramenta importante para o manejo nutricional das culturas, auxiliando no diagnóstico da fertilidade do solo para a recomendação racional de fertilizantes (EMBRAPA SOLOS, 2009).

Conhecer os teores de nutrientes minerais em tecidos vegetais é essencial para o diagnóstico do estado nutricional das plantas por diferentes metodologias, tais como: Nível Crítico e Faixa de Suficiência (ULRICH e HILLS, 1967), , Índices Balanceados de Kenworthy

(KENWORTHY, 1961), DRIS (BEAUFILS, 1973), e Chance Matemática (WADT, 1996). Entretanto, é necessário que o método utilizado apresente elevada exatidão na determinação dos teores, para que a ferramenta de diagnóstico seja efetiva (TEDESCO et al., 1995).

Além da exatidão inerente a um bom método analítico é altamente desejável que o mesmo produza pouco resíduo, seja adequado para o maior número possível de elementos, apresente baixo risco operacional, seja de simples execução e de baixo custo financeiro (SILVA, 2008; FERREIRA, 2014).

**Métodos de Mineralização-** a mineralização dos compostos orgânicos contidos nos tecidos vegetais é a principal etapa dos métodos. Durante essa etapa, compostos orgânicos são mineralizados quimicamente (dissolução) ou fisicamente (carbonização).

Métodos de carbonização envolvem a completa combustão do material orgânico, seguindo pela dissolução ácida dos constituintes minerais remanescentes. Esses métodos são tidos como vantajosos pela facilidade operacional e ao baixo background (matriz branco), no entanto alguns trabalhos relatam baixas recuperações de alguns elementos por tais métodos (ALLEN, 1974). Os principais fatores relacionados à baixas recuperações de elementos pela carbonização, devido a volatilização, são associados a temperatura e tempo de aquecimento, a composição da amostras e a estrutura do cadinho (ALLEN, 1974).

Elementos não metais podem ser perdidos por volatilização, a exemplo do enxofre e boro, especialmente a partir de 550 °C. Assim, a temperatura de calcinação deve ser mínima, porém suficiente para assegurar a mineralização da matéria orgânica (FERREIRA, 2014).

Já a digestão ácida de amostras vegetais tem como princípio o uso de agentes químicos oxidantes da matéria orgânica, apresentando algumas vantagens em relação à combustão, a citar (EMBRAPA, 2009): ausência de perdas de elementos por volatilização e a determinação de muitos elementos químicos em apenas uma solução de digestão. Entretanto, entre as principais desvantagens desse métodos está o risco de explosões durante as digestões, especialmente quando se utiliza ácido nítrico, ácido perclórico ou mistura de ambos (ALLEN, 1974). De fato, Bernardi, Oka e Souza (2010) utilizando digestão úmida nítroperclórica (4:1 v/v) avaliaram que apesar de solubilizar satisfatoriamente as amostras de capim-tanzânia e alfafa, o método apresenta inconvenientes, como: a produção de muitos vapores tóxicos, com risco de explosões, o que exige equipamentos especiais (capela de gases e blocos digestores), além de os reagentes serem de difícil aquisição, pois são controlados pelo Exército.

A comparação de métodos de mineralização tem mostrado diferentes resultados, não sendo possível ainda se eleger um melhor procedimento para variadas condições. Menezes et al. (2017) fizeram uma comparação entre digestão seca em cadinho de porcelana de AOAC (1982) e digestão úmida nítroperclórica de folhas de orégano, e concluíram que a digestão úmida foi mais eficaz na quantificação de K, limitando os estudos somente a esse elemento. Silva et al. (2017) contrastando a digestão úmida nítroperclórica em plantas de trigo, girassol e soja (3/1) (Tedesco, 1995) com a calcinação que chega a 190° C por 4 horas diagnosticaram perdas expressivas de nutrientes por volatilização, especialmente P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn e Zn. Por outro lado, apontaram que houve contaminação de B na digestão úmida, muito provavelmente devido ao tubo de digestão constituir-se de borosilicato.

Ferreira (2014) comparou a eficácia da digestão com água régia, na proporção 3:1 (McGrath e Cunliffe, 1985), com a digestão seca em cadinho de porcelana (Silva, 2009) e conclui que a digestão úmida foi vantajosa por possibilitar a obtenção de extrato multinutriente e facilidade de preparo de curvas analíticas, reduzindo problemas analíticos em etapas subsequentes à digestão, enquanto a digestão seca apesar de pouco poluidora e de simples execução, é mais lenta e pode promover perdas de alguns nutrientes por volatilização e estão mais sujeitas a contaminação externa, já a água régia apresenta menor risco operacional e ambiental que as demais, é de simples execução rotineira, porém deixa resíduos amarelados no extrato obtido, devido a presença de óxido nítrico e é a que apresenta menor índice de

recuperação de elementos químicos. A digestão por água régia também deixa um pouco de resíduos sólidos no fundo, indicando que não houve digestão completa do material.

Vila Nova (2012) avaliou as metodologias de digestão úmida nitroperclórica na relação 7:1 de Zasousk e Barau (1977) e digestão seca em cadinho de porcelana, constatando que a digestão úmida promoveu maior recuperação de Ca, Mg e Zn, no entanto o autores sinaliza que é uma metodologia que apresenta riscos de explosões devido ao ácido perclórico e também restrições na manipulação, já que se utilizada de ácidos fortes. Notou-se ainda que há uma elevada variância entre os métodos de calcinação e nitroperclórico nos valores de Cu e Fe e que a calcinação é mais eficiente para a determinação de Cu.

A Embrapa (2000) testou a digestão nitroperclórica na proporção 2:1, na qual verificou-se que essa metodologia alcançava maior precisão na determinação de Fe e Zn quando comparadas a padrões de qualidade interlaboratoriais, além de minimizar os custos pelo menor uso de reagentes e de ser menor geradora de resíduos.

Enfim, a comparação entre os métodos de análise foliar carece de mais estudos, uma vez que faz-se importante a descoberta de uma metodologia que alie a obtenção de uma maior quantidade de elementos com boas condutas ambientais, operacionais, temporais e até mesmo do próprio material que se avalia.

#### 4. CONCLUSÕES

Métodos de mineralização de material vegetal baseados em digestão nitroperclórica úmida são mais difundidos mundialmente, apresentam vantagens em relação a métodos de calcinação, destacando-se que não implicam em perdas de elementos químicos durante a marcha analítica, porém, são mais perigosos devido ao elevado risco de explosões e acidentes durante as etapas de mineralização. Adicionalmente, possuem também como desvantagens a dificuldade de aquisição e elevados custos com reagentes, e possibilidade de contaminação das amostras com B.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALLEN, S. E., GRIMSHAW, H. M., PARKINSON, J. A., QUARMBY, C. **Chemical analysis of ecological materials**. Blackwell Scientific Publications, 1974.

BEAUFILS, E. R. **Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS): a general scheme of experimentation and calibration based on principles developed from research in plant nutrition**. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa, 1973. (Soil Science Bulletin, 1).

BERNARDI, Alberto Carlos de Campos.; OKA, Silvia Harumi; SOUZA, Gilberto Batista de. **Comparação de técnicas analíticas de extração de potássio de amostras de tecido vegetal com água e soluções ácidas concentrada e diluída**. Eclética Química, v. 35, n.2, p. 45-49, 2010.

FERREIRA, Ana Kaline da Costa. **Avaliação de métodos de análises químicas de nutrientes em tecido vegetal**. 88f. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo e Água). Mossoró: UFERSA, 2014.

KENWORTHY, A. L. Interpreting the balance of nutrient-elements in leaves of fruits trees. In: REUTHER, W. **Plant analysis and fertilizers problems**. Washington: American Institute of Biological Science, 1961. p. 28-43.





MALAVOLTA, Eurípedes.; VITTI, Godofredo César.; OLIVEIRA, Sebastião Alberto de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MARTIN-PREVEL, Pierre; GAGNARD, Jean.; GAUTIER, Philippe. **L'analyse végétale dans le controle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales**. Paris: Technique e Documentation, 1984.

MCGRATH, Stephen P; CUNLIFFE, Caroline H. **Um método simplificado para a extração de metais Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co de solos e lamas de esgoto**. *Journal of Food and Agriculture*, v. 36, n. 9, p. 794-798, 1985.

MENEZES, Maria Sirleide de; SILVA, Anna Cecília Ribeiro Alves da; SANTOS, Samuel Barbosa Tavares dos; ZAMORA, Valentin Rúben Orcon; BARRETO, Levy Paes. **Comparação entre metodologias para a determinação de Sódio e Potássio em tecido vegetal de alecrim e orégano**. Recife: UFRPe, 2017.

SARRUGE, José Renato; HAAG, Henrique Paulo. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Esalq, 1974.

SILVA, Elcimar Rédoa da; OLIVEIRA NETO, Waldemar de; ORTIZ, Fábio Rogério; CASTRO, César de. **Análise comparativa de métodos de extração de nutrientes de tecidos vegetais**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA. Londrina: Embrapa Soja, 2008.

SILVA, Fábio César da. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

TEDESCO, Marino José; GIANELLO, Clésio; BISSANI, Carlos Alberto; BOHNEN, Humberto; VOLKWEISS, Sérgio Jorge; FELISBERTO, Regina. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

NOVA, Paulo César Cavalcante Vila. **Avaliação de método convencional e digestão úmida para determinação de níveis de Fe, Mn, Ni, Cu, Co, Mg, Zn, Ca, Mo e Se em amostras secas de tomates orgânicos (*Solanum lycopersicum* L.) por Absorção Atômica de Chama (FAAS)**. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n. 4, p. 159-165, 2012.

ULRICH, A.; HILLS, F. J. Principles and practices of plant analysis. In: SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Soil testing and plant analysis**. Madison. 1967. p. 11-24. (Special Publication, Series 2).

WADT, P. S. G. **Os métodos da chance matemática e do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação nutricional de plantios de eucalipto**. Viçosa: UFV, 1996. 123p. (Tese - Doutorado).

ZASOUSK, R. J.; BURAU, R. G. **Um método de digestão rápida com ácido nítrico-perclórico para análise de multielementos em tecidos vegetais**. *Communications in soil Science em Plant Analysis*, v.8, n. 5, p. 425-436, 1977.