

MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS¹

SEBASTIÃO A. DE OLIVEIRA²

RESUMO - É apresentado um procedimento para a determinação colorimétrica de nitrogênio nas plantas, pela adaptação do método de Lindner (1944). Foram estudados o efeito do comprimento de onda, a influência do tempo de reação e do pH, interferência de alguns cátions, e o intervalo de concentração ideal para a determinação de nitrogênio. Os resultados apresentaram um baixo coeficiente de variação, não diferindo, praticamente, daqueles obtidos por destilação com Kjeldahl. Concluiu-se, então, que o nitrogênio das plantas pode ser determinado colorimetricamente em análise de rotina, com o procedimento seguido neste trabalho.

Termos para indexação: análise de plantas, nutrição vegetal.

COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINING PLANT NITROGEN

ABSTRACT - A fairly rapid and precise procedure for colorimetric determination of nitrogen in plant material is described. The effect of the wave length, the influence of reaction time and of pH, the interference of some cations, as well as the optimum concentration interval for nitrogen determination were discussed. The results showed a low coefficient of variation and are in good agreement with those obtained by Kjeldahl digestion and distillation method. It was concluded that the plant nitrogen can be regularly determined by the colorimetric method.

Index terms: plant leaf analysis, plant nutrition.

INTRODUÇÃO

O método oficial para determinação de nitrogênio se baseia na destilação da amônia em meio alcalino, utilizando o aparelho de Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemists 1975).

Trata-se, entretanto, de um método um tanto moroso, que envolve várias etapas, equipamentos e reativos, e assim, ocasiona uma maior fonte de erros, especialmente nas determinações de nitrogênio, quando presente em pequenas quantidades.

Lindner (1944) propôs um método para a determinação colorimétrica de nitrogênio em plantas, mediante a reação de amônia com o reativo de Nessler (Alexeyev 1967).

Mais recentemente, Mitchell (1972) elaborou um método para a microdeterminação de nitrogênio em material vegetal, baseando-se na reação de amônia com fenol e hipoclorito de sódio em meio alcalino e na presença de nitroprussiato de sódio.

O presente trabalho tem por objetivo estudar o método proposto por Lindner (1944), com o intuito de empregá-lo em análises de rotina para a determinação de nitrogênio em plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Solução 350 $\mu\text{g N/ml}$: pesar 1,652 g de sulfato de amônia p.a., e transferir para balão volumétrico de 1.000 ml. Adicionar água até dissolver o sal e em seguida 1 ml de colofórmio como substância preventiva (Jackson 1976). Completar o volume e guardar em frasco escuro na geladeira.

Solução de trabalho 0,0; 17,5 e 35,0 $\mu\text{N/ml}$: preparadas a partir da solução concentrada e acidificada a pH 1,2. O "branco" se prepara acidificando-se água destilada até o pH acima mencionado, com ácido sulfúrico concentrado. Guardar em frasco escuro.

Solução NaOH - 2,5 N

Solução de metassilicato de sódio (Na_2SiO_3) a 10%: deixar em repouso por uma noite e filtrar, utilizando papel de filtro de filtragem semilenta. Este reagente tem a finalidade de evitar a turbidez.

Solução mista $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{SiO}_3$ (1:1): misturar partes iguais das soluções anteriores.

Reativo de Nessler: pesar 45,5 g de HgI_2 e transferir para balão volumétrico 1.000 ml. Dissolver o sal em água, adicionar 34,9 g de KI e 112 g de KOH, agitar bem e completar o volume. Deixar em repouso por três dias, e transferir o sobrenadante para um frasco escuro. Este reativo assim preparado tem a grande vantagem de ser estável por vários anos (Vanselow 1940).

Solução 250 $\mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$

Solução 250 $\mu\text{g Fe}^{3+}/\text{ml}$

¹ Aceito para publicação em 27 de agosto de 1980.

² Químico, M.S., Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade de Brasília, UnB, CEP 70.910 - Brasília, DF.

Solução 250 $\mu\text{g Zn}^{+2}/\text{ml}$

Solução 500 $\mu\text{g Mn}^{+2}/\text{ml}$

Solução 100 $\mu\text{g Mg}^{+2}/\text{ml}$

Soluções 0,5 $\mu\text{g Al}^{+3}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g Fe}^{+3}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g Zn}^{+2}/\text{ml}$, 1,0 $\mu\text{g Mn}^{+2}/\text{ml}$ e 1,0 $\mu\text{g Mg}^{+2}/\text{ml}$, preparadas a partir das soluções concentradas.

Digestão do Material Vegetal

Pesar 0,1 g do material vegetal, transferir para um frasco de digestão de 50 ml e adicionar 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 15 minutos de repouso, colocar na chapa de aquecimento, e elevar lentamente até, aproximadamente, 300°C. Com o aparecimento de uma nuvem densa de fumaça, retirar o frasco, esfriar e adicionar 0,5 ml de água oxigenada 30% (100 volumes). Aquecer novamente até o extrato ficar incolor, passando em seguida para uma coloração escura. Retirar, esfriar e adicionar cinco gotas de água oxigenada concentrada. Digerir até obter uma coloração clara definitiva. CUIDADO: a adição de água oxigenada em excesso poderá ocasionar a oxidação de partes do íon amônio a nitrito e/ou nitrato. Após a digestão filtrar e completar o volume a 100 ml. O extrato assim obtido apresenta um pH variando de 1,0 a 1,2.

Comprimento de onda.

Mediu-se absorvância do reativo de Nessler e do complexo para uma concentração de 4,0 $\mu\text{g N}/\text{ml}$, após 30 minutos, variando o comprimento de onda de 480 a 410 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Carls Zeiss e cubetas de 1 cm.

Influência do tempo no desenvolvimento da coloração do complexo

Mediu-se a absorvância para uma solução de 1,75 $\mu\text{g N}/\text{ml}$, nos diferentes tempos de reação, para um comprimento de onda de 440 nm.

Influência do pH na absorvância

Adicionaram-se 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 ml de NaOH 2,5 N, a uma solução de concentração 3,5 $\mu\text{g N}/\text{ml}$, e o pH foi medido após completada a reação.

Interferência de diversos cátions

Em função das concentrações do alumínio (Fulani et al. 1977), ferro, zinco, manganês e magnésio (Hewitt & Smith 1974) adicionaram-se quantidades crescentes destes íons a uma solução de 1,75 $\mu\text{g N}/\text{ml}$.

Influência da concentração de nitrogênio na absorvância.

Mediu-se a absorvância para as concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 $\mu\text{g N}/\text{ml}$.

Curva padrão

Para balões volumétricos de 50 ml, pipetar na seguinte ordem: 5 ml de cada solução de trabalho de nitrogênio, 25 ml de água destilada, 2 ml da mistura NaOH/Na₂SiO₃, agitar e adicionar 1 ml do reativo de Nessler. Agitar, completar o volume e após quinze minutos fazer a leitura a 440 nm.

Na determinação do nitrogênio no material vegetal, pipetar 5 ml do filtrado e seguir o procedimento da curva padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os valores de absorvância obtidos com o reativo de Nessler e o complexo para diferentes comprimentos de onda.

Como se pode observar, para um comprimento de onda de 440 nm, a absorvância do reativo de Nessler é nula, ao passo que o complexo absorve dentro do intervalo de 0,20 a 0,70, no qual se obtém um erro mínimo e sensivelmente constante (Willard et al. 1965), para um grau de incerteza de 0,2%.

Este valor de comprimento de onda se encontra bem próximo do usado por Catani et al. (1969), o qual foi de 430 nm, mas discorda do valor recomendado por Ländner (1944), que era a utilização de um filtro azul (465-487 nm) (Ewing 1972), e de Braga (1980), que, para a determinação do íon amônio no solo, recomenda fazer a leitura a 410 nm.

Na Tabela 2, encontram-se os valores de absorvância obtidos para os diferentes tempos de reação.

A mesma Tabela mostra que o complexo formado é estável no intervalo compreendido entre cinco minutos e onze horas, havendo um incremento de apenas 4,6% na absorvância após 24 horas. Optou-se, entre

TABELA 1. Absorvância do reativo de Nessler e do complexo em função do comprimento de onda.

Comp. onda (nm)	Reativo Nessler	Complexo
480	0,000	0,370
470	0,000	0,420
460	0,000	0,480
455	0,000	0,510
450	0,000	0,540
445	0,000	0,580
440	0,000	0,620
435	0,005	0,660
430	0,010	0,700
425	0,015	0,750
420	0,025	0,800
415	0,045	0,860
410	0,080	0,920

TABELA 2. Influência do tempo no desenvolvimento da coloração.

Tempo.	5 min.	15 min.	30 min.	1 h.	11 h.	24 h.	72 h.
Absorb.	0,325	0,325	0,325	0,325	0,325	0,324	0,324

entretanto, para um tempo de reação de quinze minutos, sendo a mesma conduzida a temperatura ambiente (23 a 25°C).

Na Fig. 1, observa-se a influência do pH e do volume de NaOH 2,5 N na absorbância. Como se pode observar, com a adição de 0,8 e 1,4 ml da base, o pH final da solução varia de 12,10 a 12,25, enquanto que a absorbância varia de 0,540 a 0,570, com um incremento de 5,6%. Este incremento passa a ser de 11% quando o pH alcança o valor de 12,35, para uma absorbância de 0,6000. Na mesma figura, nota-se que com a elevação do pH ocorre um aumento na absorbância, possivelmente devido à formação de precipitados dos íons mercúrio presentes em excesso no reativo de Nessler.

Ao se comparar o valor de absorbância da Tabela 2 com o mostrado na Tabela 3, para a concentração de 1,75 µg N/ml, nota-se que naquele, o valor obtido foi maior. Isto se deve ao fato de a solução de trabalho utilizada não ter sido ajustada a pH 1,2.

Os resultados obtidos no estudo de interferência de diversos cátions encontram-se na Tabela 3.

Conclui-se que, para as concentrações normalmen-

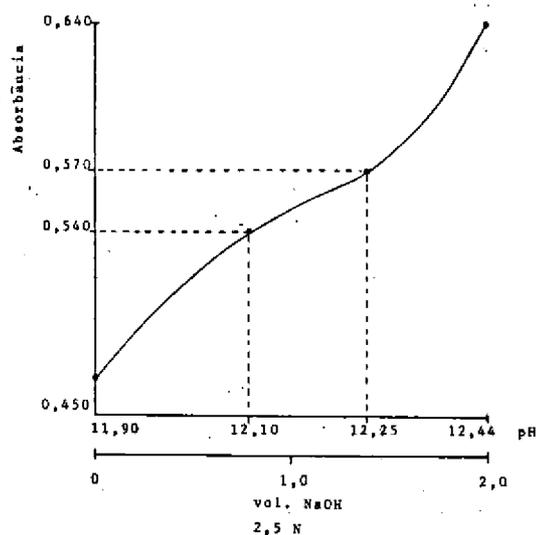


FIG. 1: Influência do volume de hidróxido de sódio e do pH na absorbância.

te encontradas nas plantas, os cátions mencionados não interferem no desenvolvimento do complexo.

Catani et al. (1969) observaram que, na determinação dos íons amônio no solo com o reativo de Nessler, os cátions ferro e manganês só interferem para concentrações acima de 1,0 e 0,5 µg/ml respectivamente, enquanto que os cátions cobre e alumínio não interferem para concentrações de até 1,5 e 10,0 µg/ml, respectivamente.

Na Fig. 2, pode-se observar que, para uma concentração de nitrogênio de até 4,0 µg N/ml, a lei de Beer é obedecida. Não foram estudados valores mais altos, porque o teor de nitrogênio nas plantas se encontra, comumente abaixo de 4%.

Visto que para um grau de incerteza de 0,2% o erro mínimo é obtido para valores de absorbância de 0,20 a 0,70 (Willard et al. 1965), resolveu-se trabalhar com valores de 0,0; 1,75 e 3,50 µg N/ml, na elaboração da curva-padrão. A equação de regressão foi ajustada à origem (Snedcor & Cochran 1977).

Nas condições de trabalho aqui mencionadas, pode-se dizer que, para um grau de incerteza de 0,2%, o método é capaz de detectar 1,0 µg N/ml quando pre-

TABELA 3. Interferência de diversos cátions.

Elemento	µg/ml	Equiv. plantas (ppm)	Absorb.
N	0,00	----	0,000
	1,75	1750	0,310
Al ³⁺	0,01	100	0,310
	0,03	300	0,305
	0,05	500	0,310
Fe ³⁺	0,01	100	0,310
	0,03	300	0,305
	0,05	500	0,310
Zn ²⁺	0,01	100	0,310
	0,03	300	0,305
	0,05	500	0,310
Mg ²⁺	0,20	2000	0,320
	0,60	6000	0,310
	1,00	10000	0,305
Mn ²⁺	0,02	200	0,310
	0,06	600	0,300
	0,10	1000	0,300

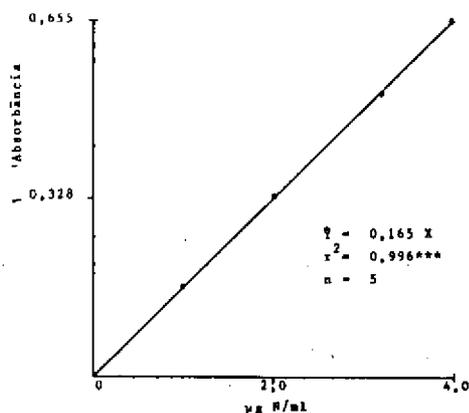


FIG. 2: Influência da concentração de nitrogênio na absorvância.

sente na solução. Segundo Lindner (1944), o reativo de Nessler é capaz de detectar até $0,01 \mu\text{g N/ml}$, não mencionando com que grau de incerteza. Willard et al. (1965) consideram como limite prático em trabalho de rotina um grau de incerteza de 0,2%.

TABELA 4. Valores de nitrogênio (%) obtidos pelo método Kjeldahl (média de 26 repetições) e pelo método colorimétrico, na ausência e na presença de metassilicato de sódio (média de 5 repetições, em diferentes extratos).

Amostra	CPAC (Kjeldahl) (%)	Colorimetria Sem Na_2SiO_3 (%)	CV (%)	Colorimetria com Na_2SiO_3 (%)	CV (%)
Soja	2,65	3,25	5,15	2,55	4,91
Milho-2	0,88	1,13	7,02	0,99	6,23
Milho-3	0,75	0,98	2,66	0,84	2,99

CONCLUSÕES

1. O comprimento de onda de 440 nm resultou ser o mais indicado para a determinação colorimétrica de nitrogênio com o reativo de Nessler.

2. A coloração do complexo formado é estável no intervalo de cinco minutos até onze horas.

3. O intervalo de pH ideal para as leituras da absorvância encontra-se entre 12,0 a 12,2.

4. Nas concentrações que comumente são encontrados nas plantas, os cátions alumínio, ferro, zinco, manganês e magnésio não interferem na determinação de nitrogênio nas condições de trabalho empregadas.

5. A adição de metassilicato de sódio elimina a turbidez ocasionada pelos cátions presentes na solução.

Na Tabela 4, encontram-se os resultados obtidos na determinação de nitrogênio por colorimetria, na ausência e na presença de metassilicato de sódio, em três amostras-padrão utilizadas pelo CPAC/EMBRAPA.

Concluiu-se que, na ausência do metassilicato de sódio, os precipitados dos cátions formados interferem ocasionando valores mais altos de absorvância, e conseqüentemente maiores teores de nitrogênio são encontrados. Ao passo que, na presença do metassilicato de sódio, os valores de nitrogênio encontrados praticamente não diferem daqueles determinados por destilação com o aparelho Kjeldahl; ademais, apresentaram baixos coeficientes de variação.

Portanto, o nitrogênio presente nas plantas pode ser determinado colorimetricamente em análise de rotina, segundo o procedimento seguido neste trabalho. É um método bastante preciso, sensível, de fácil execução, rápido, além de barato, pois utiliza reagentes e equipamentos comumente encontrados nos laboratórios de análises. Possui também a grande vantagem de, no mesmo extrato, poderem ser analisados fósforo, potássio, cálcio e magnésio.

6. Para concentração de até $4,0 \mu\text{g N/ml}$, a lei de Beer é obedecida, com um grau de incerteza de 0,2%.

7. O procedimento descrito neste trabalho permite avaliar com rapidez e precisão os teores de nitrogênio presentes nas plantas.

REFERÊNCIAS

- ALEXEYEV, V. *Qualitative analysis*. Moscou, Mir Publishers, 1967.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Washington, EUA. *Official methods of analysis*. Washington, DC, 1975.
- BRAGA, J.M. *Avaliação da fertilidade do solo (análise química) II Parte*. Viçosa, Imprensa Universitária, 1980.

- CATANI, R.A.; BITTENCOURT, V.C. & CANGIANI, A.M. Extração e determinação do íon amônio no solo. *An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 26: 57-73, 1969.
- EWING, G. W. *Métodos instrumentais de análise química*. São Paulo, Edgard Blücher, 1972. v.1.
- FURLANI, E.J.; BATAGLIA, O.A. & FURLANI, A.M.C. Composição química de três cultivares de arroz, *Bragantia*, 36(8):109-15, 1977.
- HEWITT, E.J. & SMITH, T.A. *Plant mineral nutrition*. London, The English Universities Press, 1974.
- JACKSON, M.L. *Análisis químico de suelos*. Barcelona, Omega, 1976.
- LINDNER, R.C. Rapid analytical method for some of the more common inorganic constituents of plants tissues. *Plant Phys.*, 19:76-89, 1944.
- MITCHELL, H.L. Microdetermination of nitrogen in plant tissues *J. AOAC*, 55 (1): 1-3, 1972.
- SNEDCOR, G.W. & COCHRAN, W.C. *Métodos estatísticos*. México, Comp. Ed. Continental, 1977.
- VANSELOW, A.P. Préparation of Nessler's reagent. *Ind. Eng. Chem.*, 12:516-7, 1940.
- WILLARD, H.; MERITT JÚNIOR, E. & DEAN, J. *Análise instrumental*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkia, 1965.