

ANÁLISE DE TECIDOS VEGETAIS POR MEIO DE "SPOT TESTS" ¹

CLÓVIS SILVA FERNANDES²

Sumário

No presente trabalho são descritos e discutidos os métodos atuais de análise de tecidos ou de diagnose foliar por meio de "spot tests". Sensíveis aprimoramentos de técnicas de trabalho e dois métodos originais para determinação de cálcio e zinco são ainda apresentados.

INTRODUÇÃO

Revisão dos trabalhos anteriores

"Spot test" ou teste de mancha se define como um micrométodo da química analítica no qual são utilizadas quantidades mínimas do material a analisar e do reagente.

No "teste de mancha" conhecido também como "análise de toque" as reações são conduzidas preferencialmente em placas de toque, microcadinhos, fragmentos de papel de filtro ou mesmo diretamente sobre o material a analisar ou material problema.

A presença dos elementos pesquisados (anion, cation, grupo funcional) pode ser caracterizada através de reações coradas, decoloramentos ou precipitados.

O trabalho pioneiro no campo dos "spot tests" é segundo Feigl (1958) devido a F. Runge, o qual em 1834 utilizou papel impregnado com iodeto de potássio e amido, na detecção do cloro.

Uma revisão bibliográfica sobre o limiar da técnica do "spot test" até a atualidade nos é dada por Feigl (1939, 1958) que através de um trabalho solidamente bem conduzido organizou a Escola de Análise de Toque cujos métodos mais gerais se encontraram condensados em "Spot Tests for Inorganic Analysis" e "Spot Tests for Organic Analysis".

O primeiro trabalho no qual foram utilizadas reações de toque ou de mancha no estudo da nutrição das plantas é devido a Hoffer (1934) que aplicou a difenilamina e o ácido sulfúrico na caracterização de nitrato, e o sulfocianeto de potássio na localização de ferro diretamente em colmo de milho.

A aplicação da reação de Griess (Bray 1945) para nitrato foi introduzida por Bray (1948) para detecção de nitrato, após sensíveis modificações e aprimoramento de técnica.

O teste semiquantitativo para potássio baseado na reação de Polluektof (Silva *et al.* 1942) foi desenvolvido por Melsted (1950).

Chong e Bray (1952) descreveram dois métodos originais, semi-quantitativos de "spot tests" para a caracterização dos níveis de magnésio e cálcio em plantas cultivadas.

Fernandes (1956) realizou um trabalho de apreciação geral sobre os três métodos de "spot tests" mais usualmente utilizados nos Estados Unidos e no Japão para diagnose rápida da nutrição das plantas.

Fernandes (1964) divulgou um método capilarmétrico de "spot test" para determinação de magnésio em vegetais.

Trabalhos sobre utilização de métodos rápidos de diagnose foliar incluindo testes de mancha têm sido conduzidos na França e na Rússia por Lecom (1959) Delmas *et al.* (1959) e Tserling (1956).

Indicações sobre a aplicação de "spot tests" para NPK na diagnose foliar do algodão foram divulgadas recentemente por Hardy (1962).

Jackson (1958), Morgan e Wickstrom (1956) descrevem detalhadamente a preparação e o modo de utilização das três reações de mancha mais usualmente utilizadas na análise de tecidos vegetais para diagnóstico da nutrição.

Uma expressiva cromo-visualização de teste de Bray em colmo do milho nos é dada por Hoffer e Krantz (1951).

Bases teóricas

Os elementos químicos absorvidos pelas plantas podem ser encontrados nos tecidos celulares tanto em formas solúveis quanto insolúveis. As formas inso-

¹ Trabalho apresentado ao Simposium Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, XVI Congresso da Sociedade Botânica do Brasil, 1965. Foi recebido, para publicação em 29 de agosto de 1966 e constitui o Boletim Técnico n.º 8 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste (IPEANE).

² Eng.º Agrônomo, Seção de Botânica do IPEANE, Caixa Postal 205, Recife, Pernambuco.

lúveis podem encontrar-se como constituintes de compostos simples ou complexos, chelados, em ligação prostética ou adsorvidos nos colóides protoplásmicos. Em tais condições, podem ou não ser detectados diretamente através de testes rápidos de mancha.

As formas solúveis, lábeis, fraca ou fortemente ionizáveis podem ser, facilmente e isoladamente, apreciadas por meio de "spot tests" desde que sejam afastadas as interferências, principalmente iônicas.

Nas formas solúveis, transitórias ou não, o teor atual tanto expresso em peso sobre volume de suco celular, em peso sobre peso de material verde ou material seco, pode estar relacionado com o crescimento e a produtividade.

A detecção das formas solúveis pode ser conduzida por métodos rápidos turbidométricos ou colorimétricos, nos quais estão incluídos os "spot tests" semi-quantitativos.

Seis elementos podem ser facilmente detectáveis para fins de diagnose foliar rápida através de testes de mancha. São eles: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e zinco.

Nitrogênio. O nitrogênio tomado pelas plantas como nitrato, pode permanecer neste estado em teores apreciáveis antes de ser reduzido, teores estes que estando correlacionados com o crescimento, podem ser determinados e utilizados como indicadores da nutrição azotada. Para determinados vegetais entretanto, onde a redução se dá nos órgãos subterrâneos, ou onde a redução é rápida, a presença de nitrato em determinados órgãos, ou de um modo sistêmico, pode estar correlacionada com deficiências de outros elementos como cálcio, enxofre, molibdênio. Em tais casos a aplicação do teste de Bray é de suma valia.

Quanto ao teor de nitrogênio nítrico como indicador de nutrição normal, Emmert (1942) logrou estabelecer estatisticamente estreita correlação entre a produção do tomateiro e o nitrato foliar.

Krantz *et al.* (1948) usando o método de difenilamina-ácida sulfúrico nos dão indicações sobre a diagnose da deficiência de nitrogênio em milho e algodão, em função do nitrato foliar.

Fernandes (1958, 1960) trabalhando em soluções nutritivas com tomateiro e milho, demonstrou que a expansão foliar de ambas as plantas está correlacionada com o teor de nitrato no pecíolo e na base da nervura central de folhas jovens, interdependência que pode ser expressa respectivamente pelas seguintes equações:

$$\text{Tomateiro: } y = 37,9 - 0,24 x \quad r = 0,90$$

$$\text{Milho: } y = 22,8 - 0,026 x \quad r = 0,85$$

Fósforo. No caso do fósforo a acumulação é regulada pela atividade respiratória e a fotossíntese.

O fósforo mineral constitui, na planta normal, uma apreciável parte em relação ao fósforo orgânico. Para as folhas do milho, cerca de 35,9% está em forma inorgânica, segundo Colin, citado por Demolon (1946).

O teor do fósforo inorgânico solúvel, incluindo o fósforo liberado de formas lábeis ou hidrolizáveis durante o processo de determinação tem sido utilizado para a interpretação da nutrição fosfórica (Jackson 1958, Morgan & Wickstrom 1956, Hoffer & Krantz 1951, Krantz *et al.* 1948).

A reação de Osmond, conduzida segundo normas especiais sobre pequenos retângulos de papel de filtro impregnados de suco celular ou extrato ácido de material seco, produz em função do teor de fósforo presente, uma gama de tonalidades de azul que permite caracterizar concentrações entre zero e 200 ppm, com estágios de 15,40 e 100 ppm.

Potássio. O potássio apesar de suas funções complexas na fotossíntese, na biossíntese das bases do ácido nucléico e na formação de piruvato se encontra em quase sua totalidade em solução no suco celular. Parte do potássio não detectável em relação ao teor total se encontra adsorvido nos colóides protoplásmicos.

O "spot test" usualmente empregado na determinação do potássio é baseado na reação de Polluecktof (Feigl 1939, 1958, Silva *et al.* 1942) adaptada a uma variante semi-quantitativa por Melsted (1950).

O "spot test" de Melsted (1950) modificado por Fernandes (1960) permite caracterizar concentrações de 1,00 - 0,50 - 0,20 - 0,10 - 0,04% de potássio em suco celular, sendo a principal característica da modificação introduzida o aumento da sensibilidade pela adição de traços de hidróxido de cálcio à solução problema o que em parte bloqueia a interferência inibidora do sódio e dos colóides contidos na solução do problema.

Magnésio. Com referência ao magnésio, sabe-se que as folhas das plantas contêm aproximadamente 0,67 a 1,27% de clorofila sobre matéria seca. A clorofila por sua vez contém 2,7% de magnésio. Muito mais magnésio é necessário estar presente para que a fotossíntese se processe normalmente, não somente magnésio iônico ativador de enzimas e coenzimas ou magnésio constituinte de enzimas ou coenzimas, mas magnésio em combinações inorgânicas.

Cheng e Bray (1952) nos apresentam a descrição de um método semiquantitativo para a determinação de magnésio solúvel nas plantas e indicam normas para a diagnose da nutrição magnésica em milho,

videira e amendoim. O "spot test" de Cheng e Bray (1952) utiliza como reagente o Eriocromo T. (Sodium 1 - (1 - hydroxy 2 - naphthylazo - 6 - nitro - 2 - naphthol - 4 - sulphate).

Fernandes (1964) partindo das normas dadas por Cheng e Bray (1952) desenvolveu um método cromo-capilarimétrico para a determinação do nível de magnésio nas plantas cultivadas.

Cálcio. O cálcio por sua vez está entre outras funções, relacionado com a atividade de fosfatase, formação de amidas, ciclo de Krebs e permeabilidade da membrana celular.

Como elemento plástico, se encontra no cimento intercelular e como catabolito ou reserva cálcica, sob a forma de rafídios e cristólitos.

O cálcio se extrai das plantas com água, ácido acético, ou ácido clorídrico diluído. Isto prova que o cálcio não está em união profunda com substâncias orgânicas complexas. Em sua maior parte está combinado a ácidos orgânicos. Iljin (1954)

Baseados em que o cálcio solúvel está relacionado com a nutrição cálcica, Cheng e Bray (1952) utilizando a murexida desenvolveram um "spot test" semiquantitativo para a diagnose da deficiência deste elemento nas plantas. Não indicam todavia normas de interpretação.

Dada a gama restrita de tonalidades que a murexida permite verificar entre um máximo e um mínimo de cálcio, Fernandes (1959) partindo do método de Goldenstein e Stark Meyer (Feigl 1958) logrou adaptá-lo às normas de um teste de mancha em papel de filtro muito mais preciso que o da murexida de Cheng e Bray (1952). O método de Goldenstein e Stark Meyer é baseado na formação de sais complexos coloridos quando se fazem reagir bases de Schiff com ions metálicos.

Partindo-se um reagente incolor com o glioxal-bis (2-hidroxanil), atinge-se entre zero e 100 ppm de cálcio uma gama de tonalidades de róseo a vermelho sanguíneo que permite caracterizar concentrações de 5, 10, 15, 25, e 50 ppm.

Zinco. Apesar de integrado na categoria dos micronutrientes que podem atuar em concentrações bem baixas da ordem 20 ppm sobre matéria seca, o zinco em alguns casos pode atingir a teores bem elevados como no tabaco, onde a acumulação alcança a 2000 ppm.

No sentido de poder caracterizar estados de carência de zinco, em plantas que ainda não tenham apresentado sintomas foliares típicos de um modo rápido e relativamente preciso em condições de campo, Fernandes (1958), logrou desenvolver um teste semiquantitativo em papel de filtro à base de

ditizonato de sódio. Este "spot test" permite detectar diretamente sobre os tecidos das plantas ou sobre suco celular, teores de zinco entre 2 e 50 ppm com estágios intermediários de 5, 10 e 25 ppm através de uma gama de tonalidades entre róseo e magenta ou púrpura.

Outros elementos. Em relação às determinações de manganês, cobre, ferro, boro e molibdênio, tem sido possível a aplicação de "spot test" semiquantitativos em cinzas, modalidades de determinações estas que por se constituírem mais complexas fogem ao caráter prático dos testes rápidos para fins agrícolas.

Informações bibliográficas pouco precisas têm informado sobre o uso de testes de campo à base de azul de metileno para a detecção da carência de enxofre.

Possibilidades e limitações dos "spot test" na diagnose da nutrição das plantas

As possibilidades de êxito na aplicação de "spot test" dependem da precisão dos métodos e do conhecimento das normas de utilização e interpretação dos resultados.

Quando se trabalha com uma única cultura como o milho ou o tomateiro, adotando-se normas de diagnóstico estabelecidas alhures, ou melhor ainda, localmente, o técnico em nutrição ou mesmo o agricultor pode atingir um alto grau de senso interpretativo.

A exata possibilidade de funcionamento de qualquer método de diagnose foliar depende unicamente de saber quais os elementos e em quais teores devem eles estar presentes em determinados órgãos de determinada idade fisiológica.

Desde que pequenas diferenças de concentração de um elemento podem corresponder a variações sensíveis no rendimento, o "spot test" semiquantitativo de modo nenhum poderia equivaler-se a um método analítico de laboratório, principalmente porque os resultados obtidos pelos testes rápidos dependem muito do operador, tanto quanto ao próprio modo de operar, como em relação à acuidade visual para o discernimento de intensidade e tonalidade de cores.

O maior campo de aplicação dos "spot test" semiquantitativos está na confirmação de deficiências diagnosticadas visualmente e na previsão de estados carenciais graves ainda não caracterizados através de uma sintomatologia foliar típica.

Como material didático os métodos de "spot test" semiquantitativos constituem excelentes meios de demonstração para os estudos de nutrição das plantas e das enfermidades fisiogênicas por deficiência alimentar.

NORMAS DE ANÁLISE

Determinação direta nos tecidos.

A determinação direta nos tecidos pode ser realizada na própria planta ou em fragmentos dela retirados. Na determinação direta o reativo é colocado sobre um corte procedido no caule, como é o caso da detecção de nitrato em colmo de milho pelo reativo de Bray (Fernandes 1956).

Tratando-se de fragmentos de órgãos foliares (pecíolos, nervuras), os mesmos são colocados juntamente com o reativo, ou o papel indicador no interior da dobra de uma espátula de polietileno, sendo em seguida prensados com um pequeno alicate.

Determinação em suco celular

Para amostras maiores, colhidas após andamento casualizado no campo, o material é colocado em uma pequena cuba de polietileno e esmagado com um pistilo de material plástico rígido. O suco celular é então separado por meio de uma seringa, em cujo extremo se encontra adaptado um tubo flexível, de material inerte contendo algodão hidrófilo. As determinações analíticas são processadas sobre gotas de suco celular colocadas em cápsulas de plástico, placas de toque, ou sobre vidro plano.

Determinação em material seco

A amostra é seca a 70°C, passada em almofariz ou moinho e peneirada a 40 mesh. Após uma permanência de 24 horas em estufa a 70°C, o material seco e desintegrado será pôsto em HCl 0,025 N à razão de 100mg por 1 ml. Após 24 horas o extrato é separado da mesma maneira que na determinação em suco celular. Em ambos os casos, tanto o suco celular quando o extrato clorídrico, devem ser colocados em frascos de vidro neutro e tampa plástica.

MÉTODOS QUÍMICOS

Nitrogênio

A prospeção da nutrição nitrogenada nas plantas tem sido conduzida através do uso de spot test para nitrato e para aminoácidos. Neste último caso, se tem utilizado a nihidrina, como tivemos a oportunidade de constatar em estojos de procedência nipônica para diagnose foliar.

O reativo utilizado na determinação de nitrogênio nítrico é baseado no teste de Griess para nitrito (Feigl, 1958), através de uma modificação de Bray (1945), na qual o veículo aquoso do reagente é

substituído, pelo sulfato de bário e o ácido acético pelo ácido cítrico. A redução do nitrato para nitrito é proporcionada pela presença de zinco metálico finamente dividido. A introdução do Manganês tem por finalidade acelerar a redução. Quando de preparação recente o reativo de Bray se apresenta como um pó branco.

Composição e preparação do reativo de Bray

Composição:

A) Sulfato de Bário - BaSO ₄	2,500 g
B) Zinco em pó - 300 a 400 mesh	0,050 g
C) Sulfato de manganês - MnSO ₄ .4H ₂ O	0,250 g
D) Ácido cítrico	1,875 g
E) Ácido sulfanílico	0,100 g
F) Alfa-naftilamina	0,050 g

Preparação:

Em um pequeno almofariz, utilizando um pistilo de porcelana ou vidro e uma espátula de aço inoxidável, misture separadamente cada uma das drogas B, C, E e F com 1/4 do peso do sulfato de bário. Reuna todas estas frações, homogenize a mistura e junte o ácido cítrico seco e bem pulverizado. Torne a homogeneizar. Ponha o reativo assim preparado em um frasco de vidro neutro e tampa plástica com cerca de 10cc de capacidade. Agite por 10 minutos e conserve ao abrigo da luz e da umidade. Para utilização em condições de campo o reativo pode ser transportado em um micromedidor, conforme sugere Fernandes (1956), ou em cargas de 3 miligramas acondicionadas em tubos plásticos de 2,0 por 0,4cm, modalidade esta introduzida recentemente pelo autor.

Determinação. No ângulo interno de um fragmento retangular de papel Munktel OOR dobrado ao meio e medindo 1,6 por 0,7cm, ponha cerca de 2 a 3 milímetros cúbicos do reativo. Após distribuí-lo por igual em uma das faces internas, comprima-a com a outra face. Tomando em seguida o papel dobrado contendo o reativo, na ponta de uma pinça, embeba-o na solução problema. Verifique a tonalidade magenta desenvolvida de acordo com o Quadro 1.

QUADRO 1. Tonalidade desenvolvida em 30, 60 e 120 segundos pela solução problema

Tempo de leitura em segundo e tonalidades desenvolvidas			N nítrico em ppm.
30	60	120	
1	1	1	1
1	1	2	5
1	2	3	20
2	3	3	50
2	3	4	100
3	4	4	250

Tonalidades segundo Villalobos e Villalobos (1947):

1. MMV - 18 - 4.º
2. MMV - 17 - 7.º
3. MMV - 15 - 8.º
4. M - 11 - 8.º
5. MR - 9 - 7.º

Na determinação de nitrato em pecíolo de algodão torna-se necessário remover a epiderme afim de eliminar a interferência do pigmento róseo nela contido.

Fósforo

A determinação do fósforo é baseada na reação de Osmond (Allport 1945) e o reativo utilizado tem sido preparado segundo a formulação de Krantz *et al.* (1948).

Composição

A) Molibdato de amônio (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄₁ .4H ₂ O	200 mg
Água destilada	5 ml
B) HCl (d = 1,19)	3,15 ml
Água destilada	1,85 ml

Preparação do reativo de Krantz. Verta vagarosamente B em A agitando com um bastão de vidro. Conserve o reativo em frasco plástico ao abrigo da luz.

No momento de usar, dilua 1 parte do reativo com 4 partes de água destilada.

Determinação de fósforo. Embeba totalmente, mas não em excesso, um retângulo de papel Munktell OOR medindo 1,6 por 0,7 cm na solução problema e coloque-o sobre uma pequena folha de papel impermeável medindo 2,3 por 3,0 cm. Ponha uma gota do reativo sobre o papel de filtro e em seguida gire sobre este um pequeno bastão de estanho medindo 6,0 por 0,7 cm. Após um minuto compare a tonalidade azul desenvolvida com os padrões seguintes segundo Villalobos e Villalobos (1947).

Tonalidade para interpretação do teor do fósforo	ppm P
CCU - 18 - 6.º	5
CU - 17 - 8.º	15
CU - 14 - 7.º	40
UUC - 11 - 8.º	100
UUC - 8 - 8.º	200

Em qualquer circunstância precede a diluições com água destilada, mesmo no caso do suco celular ou da solução problema acusar um teor correspondente ao limite superior da escala de interpretação.

Na determinação dos nutrientes em pecíolos de folha de tomateiro, remova a epiderme a fim de afastar a interferência por vèzes produzida pelo excesso de clorofila.

Potássio

O mecanismo químico de processo de determinação do Potássio pela dipicrilamina se encontra bastante estudado em um trabalho de Feigl e Dacorso (1942). O mesmo assunto é ainda discutido em amplos detalhes por Feigl (1958).

A adaptação do teste de potássio pela dipicrilamina a normas semiquantitativas foi realizada por Melsted (1950). Os métodos de preparação, uso e interpretação se encontram com algumas variantes em Jackson (1958) e em Morgan & Wickstron (1956).

As normas que seguem e que vêm sendo utilizadas pelo autor, oferecem bons resultados.

Composição do reativo

Solução A:

Dipicrilamina Merck	100 mg
Solução de Na ₂ CO ₃ a 10,6%	1 ml
Água destilada q.s.p.	10 ml

Ponha a dipicrilamina em um tubo de ensaio aferido a 10 ml. Junte 1 ml de solução de carbonato de sódio, agite com um bastão de vidro e leve à ebulição, usando chama de alcool durante 1 minuto. Esfrie e complete o volume a 10 ml.

Solução B:

Solução A	3 ml
Água destilada	2 ml

Solução C:

Solução A	2 ml
Água destilada	3 ml

As soluções A, B e C podem conservar-se sem alteração por cerca de seis meses, quando acondicionadas em frascos de vidro neutro e tampa plástica ao abrigo da luz.

Preparação de papel reativo. Em um retângulo de papel Munktell OOR medindo 4,6 por 1,1cm ponha com um microcapilar 8 milímetros cúbicos de capacidade (16,0 x 0,5) dois "spots" da solução A, um da solução B e um da solução C. Após secagem a 60.º por uns quatro minutos ponha mais um "spot" da solução A sobre o "spot" extremo de solução A (Fig. 1). Após a secagem a 60.ºC os papéis indicadores são conservados ao abrigo da luz e da umidade, condições nas quais permanecem praticamente inalte-

ráveis por cerca de dez dias, quando conservados em um refrigerador. As soluções A, B e C podem ser conservadas por cerca de seis meses.

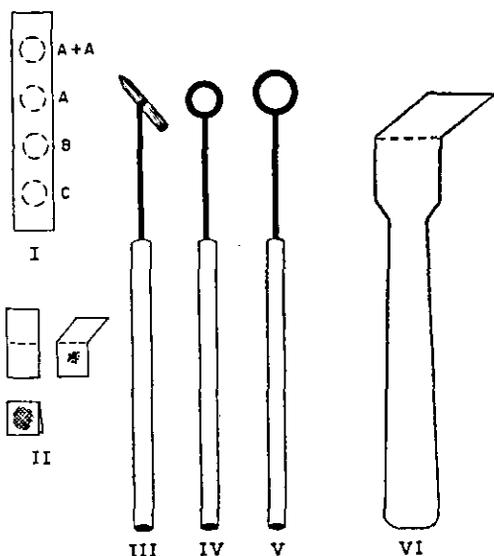


FIG. 1. Instrumental e técnicas. I: preparação do "spot test" para determinação de potássio; II: fases de determinação do nitrogênio nítrico; III: capilar para preparação do teste de potássio; IV: alça para a preparação dos testes de cálcio, magnésio e zinco; V: alça para a colocação da "solução problema" sobre os "spots" na determinação do potássio.

Determinação. O papel indicador é embebido com a solução problema, sêco ao ar ou em estufa a 60.°C e em seguida tratado com HCl normal. Na ausência de Potássio, todos os quatro "spots" serão descolorados. De acordo com o teor de potássio presente, uma ou mais de uma mancha permanecerão com a coloração primitiva alaranjada.

Os padrões podem ser preparados utilizando-se soluções de cloreto de potássio com 1,00, 0,50, 0,2, 0,10, 0,06 e 0,04 por cento de potássio.

Para a confecção de uma tabela de interpretação dos resultados obtidos são imediatamente reproduzidos a guache ou lápis colorido, tanto em relação à coloração quanto à intensidade e diâmetro das manchas.

A interferência de colóides protetores e do Sódio, pode ser removida juntando-se hidróxido de cálcio ao suco celular ou ao extrato clorídrico.

Resultados bem mais precisos são obtidos quando a solução problema é posta sobre os "spots" por meio de uma alça de nicrome tendo 2mm de diâmetro interno, confeccionada com fio de 0,8mm de espessura (Fig. 1).

Para a obtenção do hidróxido de cálcio, aqueça carbonato de cálcio até 1000.°C e após esfriar conserve no interior de uma micro-câmara com cloreto de cálcio.

Magnésio

A preparação das soluções para a determinação de Magnésio pode ser encontrada em Cheng e Bray (1952). Estes autores trabalham com três soluções e três "spots", sendo a concentração do magnésio interpretada em função da viragem de azul para vermelho em cada um dos "spots".

Com um único "spot" sobre pequenos quadrados de papel Munktell OOR medindo 0,7 por 0,7cm pode-se conseguir indicações da ordem de 50, 25, 5 e zero ppm de magnésio na solução problema. O reativo tem a seguinte composição:

Composição.

Borax - Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	50 mg
Eriochrome T Merck	15 mg
Metanol p. a.	2,5 ml
Sulfato de hidroxilamina	5 mg

Preparação. Em um frasco de vidro neutro de 5ml de capacidade com tampa plástica de pressão, ponha o borax, o eriochrome e 1,0ml de metanol. Revolva bem com um bastão, juntando o sulfato de hidroxilamina e 1,5ml de metanol. A solução se conserva bem a zero grau centígrado por cerca de 60 dias.

Os "spots" são preparados por meio de uma alça de nicrome com 1 mm de diâmetro interno, usando fio de 0,8mm de espessura. Ao abrigo do ar e da umidade os "spots" podem ser conservados por alguns dias sob refrigeração.

Para determinações mais rigorosas a solução acima poderá ser utilizada no método de "spot test" capilarimétrico de Fernandes (1964).

Tratando-se de determinação com papel reativo de um só "spot", embeba-o na solução problema tratando-o em seguida com solução saturada de borax. As cores desenvolvidas podem ser interpretadas segundo as tonalidades de Villalobos e Villalobos (1947) dadas a seguir:

Tonalidade	Magnésio em ppm
VM - 7 - 6.°	50 ou mais
UV - 6 - 8.°	25
UV - 7 - 9.°	5
CU - 7 - 12	0

Cálcio

A determinação de cálcio pode ser realizada por meio de um "spot test" em papel baseado no método de Goldenstein e Stark Meyer (Feigl 1958).

O reativo utilizado é o Glioxal-bis (2-hydroxanil) o qual pode ser preparado como segue.

Preparação do reativo. Dissolva 4,4 g de o-aminophenol em 1 litro de água a 80.°C e junte 3 ml de solução de aldeído acético a 40% em água. Conserve a mistura a 80.°C por 30 minutos e após isto ponha por 12 horas em um refrigerador. O precipitado é filtrado, lavado com água e recristalizado de metanol.

Preparação do "spot test".

Solução A:

Glioxal-bis (2-hydroxanil)	10 mg
Alcool metílico	2 ml

Solução B:

NaOH	240 mg
Alcool metílico	3 ml

Com a alça utilizada em "Magnésio" ponha a solução "A" sobre quadrados de papel Munktel OOR de 0,7 por 0,7 cm. Seque ao ar e conserve ao abrigo do ar e da luz em um refrigerador, condições nas quais o reativo poderá ser conservado por cerca de 15 dias.

A solução que deve ter sido preparada em frasco de vidro neutro, bôca larga e tampa plástica será no momento de sua preparação toda utilizada na confecção de papéis indicadores, pois se altera rapidamente

Determinação do cálcio. Embeba o papel impregnado de Glioxal-hydroxanil com a solução problema. Ponha em uma cápsula plástica e deposite sobre ela 2 gotas da solução B. Após dois minutos retire o papel com uma pinça e ponha em um recipiente com água destilada. A permanência de uma tonalidade entre róseo e vermelho sangüíneo indicará a presença de Cálcio permitindo a caracterização de concentrações da ordem de 10, 25, 50 e 100 ppm Ca. Os padrões poderão ser pintados a gouache imediatamente após a realização de testes com soluções padrões de cloreto de cálcio.

Zinco

Soluções reagentes e preparação do "spot test".

Solução A:

Ditizona Merck	5 mg
Tetracloro de carbono Reagen	5 ml
Sulfato de hidroxilamina	10 mg

Esta solução será conservada em um refrigerador, em frasco de vidro neutro com tampa de cortiça, envolvida em lâmina de plástico flexível, ou em depósito de plástico especial para tetracloro de carbono. A cor normal da solução é verde lodo. Alterando-se para verde amarelado ou amarelo deve ser descartada.

Solução B:

Tartarato de sódio e potássio	300 mg
Carbonato de sódio anidro	200 mg
Água destilada	10 ml

Com a alça utilizada em "Magnésio e "Cálcio", ponha a solução A em quadrados de papel Munktel OOR de 0,7 por 0,7 cm. Após a secagem lave a alça em álcool etílico, água destilada e ponha a solução B sobre o "spot" de ditizona. Ponha na estufa a 50.°C por 3 minutos. Os "spots" se apresentarão com a cor alaranjada e podem ser conservados sem alteração ao abrigo do ar da luz junto ao congelador de um refrigerador.

Determinação de zinco. Embeba o papel indicador na solução problema e após 2 minutos retire-os com uma pinça plástica colocando-os em água destilada.

Removida a parte do reativo que não tomou parte na reação com o zinco porventura presente, o "spot" tomará uma tonalidade entre róseo e vermelho magenta.

Soluções padrões para confecção de comparadores coloridos a gouache, deverão ser preparados com cloreto ou sulfato de zinco nas concentrações de 2, 5, 10, 25 e 50 ppm Zn.

Na presença de radicais ácidos o "spot" tomará a coloração azul difuzível em água ou removível por uma solução levemente alcalina.

Interferências. Manganês e ferro em nenhuma valência interferem. Cobalto e Cobre nas formas e concentrações que podem estar presentes não interferem.

A coloração magenta produzida pelo zinco se esvaece na presença de vapores de amônia voltando a apresentar-se com a evolução do gás.

As colorações magenta e castanho produzidas pelo Cobalto e pelo Cobre se presentes em concentrações altas são estáveis na presença de vapores de amônia.

NORMAS DE AMOSTRAGEM

As normas de amostragem para cada cultura devem ser baseadas na experimentação de campo e na análise estatística dos seus resultados.

Tratando-se de análise rápida de campo, principalmente de testes de mancha, a amostragem ideal deve corresponder ao órgão cuja mais ampla variação de composição química em determinada idade fisiológica, se reflita sistematicamente em uma menor amplitude de variação na produtividade.

Normas de amostragem para várias culturas tanto perenes como de ciclo curto são encontrados em

Krantz *et al.* (1948), Hoffer e Krantz (1951) Hoffer (1944), Hester e Shelton (1949), Hardy (1962), Tyler e Lorenz (1962), McCollam (1952) e Hanway (1962).

O número de amostras representativas de um campo de cultura, depende do porte da planta e sobretudo de dados experimentais de variação.

RESULTADOS

Os resultados são interpretados em função de dados experimentais obtidos localmente. Na rotina dos trabalhos de interpretação podem ser utilizadas tabelas e gráficos de vários tipos, entre eles o diagrama triangular de Roseboom e o polígono de Nicholas.

REFERÊNCIAS

- Alport, N. L. 1945. Colorimetric analysis. Chapman Hall., London.
- Bray, R.H. 1948. Correlation of soil tests with crop response to added fertilizer requirement. *In* Diagnostic techniques for soil and crops. American Potash Institute, p. 53-85.
- Bray, R.H. 1948. Nitrate tests for soils and plant tissue. *Soil Sci.* 60:219-221.
- Cheng, K.L. & Bray, R.H. 1952. Simple tests for magnesium and calcium in plant material and magnesium in soil. *Better Crops with Plant Food* 36:5-10.
- Colin, G. 1935. Thèse, Paris. *In* C. R. Ac. Acs 27:778. 1941. (Citado por Demelon 1946)
- Delmas, J., Routchenko, W. & Baudel, C. 1959. Contrôle de la nutrition des plantes par l'analyse minérale du sol. *Compt. Rend. Acad. Agric. Fr.* 16:796-802.
- Demelon, A. 1946. *Crossance des vejetaux cultivés.* Dunod Ed., Paris. 262 p.
- Emmert, E. M. 1942. Plant tissue test as aguideto fertilizer treatment of tomatoes. *Kentucky Agr. Exp. Sta. Bul.* 430.
- Feigl, F. 1939. Spot tests in organic analysis. Elsevier Publ. Comp., Netherlands. 462 p. (Transl. by Oesper, R. E.)
- Feigl, F. 1958. Spot tests in inorganic analysis. Elsevier Publ. Camp., Netherlands. 600 p. (Transl. by Oesper, R.E.)
- Feigl, F. & Barbosa, P. E. 1942. A identificação do potássio com diphisilamina. *In* Feigl, F., Silva, C P.J. da, Barbosa, P.E., Darcos, G.F., Miranda, L.I., Braile, N. & Cardoso, H. Boletim Depto. Nac. Prod. Mineral, Brasil, 5(9):129-144.
- Fernandes, C. S. 1965. Investigações sobre o valor de três "spot tests" para NPK na diagnose precoce de enfermidades carenciais e como indicadores de níveis nutricionais. *Bol. Téc. n.º 2 do Inst. Pesq. Exp. Agropec. do Nordeste, Brasil.* 33 p.
- Fernandes, C.S. 1958. (Dados não publicados)
- Fernandes, C.S. 1959. (Dados não publicados)
- Fernandes, C.S. 1960a. (Dados não publicados)
- Fernandes, C.S. 1960b. Fitopatologia, nutrição mineral das plantas e investigações sobre deficiência de nitrogênio em *Zea mays* L. Tese apresentada à Esc. Sup. Agric., Univ. Rural de Pernambuco, Recife. 47 p.
- Fernandes, C.S. 1964. Teste particional de mancha para determinação de magnésio em vegetais fertilizantes e corretivos. *An. XIII Congr. Soc. Bot. Brasil, antigo Inst. Micologia, Univ. Fed. Recife.* p. 61-67.
- Hanway, J.J. 1952. Plant analysis... guide for corn needs. *Better Crops with Plant Food* 46:3-50.
- Hardy, G.W. 1956. Tissue analysis of cotton. *Better Crops with Plant Food* 46(3):1-5.
- Hester, J. B. & Shelton, F. A. 1949. Know your plant and soil requirements. *Dep. Agr. Res. Campbell Soup Company. Research Monograph* 3. 99 p.
- Hoffer, D.N. 1944. Deficiency symptoms of corn and small grains. *In* Hunger signs in crops. Judd and Detweiler, Washington, p. 55-86.
- Hoffer, G. N. & Krantz, B. A. 1951. Deficiency symptoms of corn and small grains. *In* Hunger Signs in Crops. Judd and Detweiler, Washington, p. 59-105.
- Iljin, W. S. 1954. Nutrición mineral de las plantas. *Rev. Fac. Agric. Univ. Venezuela* 1:223-307.
- Krantz, B. A., Nelson, W. L. & Burkhart, L.F. 1948. Plant tissue test as a tool in agronomic research. *In* Kitchen. H. B. (ed.). Diagnostic techniques for soil crops. The American Potash Institute, Washington, p. 137-155.
- Jackson, M. L. 1958. Soil chemical analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, (xiii) 948 p.
- Lecomp, M. 1959. Tests rapides pour le controle sur le terrain de la nutrition minérale des plantes cultivés. *Compt. Reend. Acad. Agric. Fr.* 16:802-809.
- McCollam, M. E. 1952. The leaf analysis approach crop nutrition. *Better Crops with Plant Food* 36. 10 p. (Separata)
- Melsted, S.W. 1950. A simplified field test for determining potassium in plant tissue. *Better with Plant Food* 34:26-45.
- Morgan, N. D. & Wisckstrom, G. A. 1956. Give your plants a blood test-guide to quick tissue tests. *Better Crops with Plant Food* 40. 10 p. (Separata)
- Tserling, V. 1956. Le diagnostic des besoins des plantes en engrais. *Analyses des plants et problemes des fumures minerales. Inst. Rech. Huiles et Oléagineux,* p. 140-141.
- Tyler, K. B. & Lorenz, O. A. 1962. Diagnosing nutrient needs in vegetables. *Better Crops with Plant Food* 46:3,6-13.
- Villalobos, D. C. & Villalobos, J. 1947. *Color atlas.* Lib. el Atteneo, xv. 75 p.

ANALYSIS OF VEGETABLE TISSUE THROUGH SPOT TESTS

Abstract

The current methods of tissue analysis or foliar diagnosis through spot tests are described and discussed in the present work. Improved sensitivity in work techniques and two original methods for determination of calcium and zinc are also presented.