

MÉTODO SIMPLIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NAS FÔLHAS, COM O ÁCIDO FENOLDISSULFÔNICO (1). J. ROMANO GALLO e W. L. LOTT. Nos trabalhos experimentais com café, milho (2), cana-de-açúcar, algodão e batatinha, a análise de nitrato nas fôlhas vem sendo estudada como técnica para diagnose da deficiência de nitrogênio nestas culturas. Seu interêsse depende ainda de investigação local. Essa forma de combinação, quanto ao processo químico, é determinada pelo método do ácido fenoldissulfônico, tendo sido a maior parte da marcha analítica adaptada do trabalho de Johnson e Ulrich (3). Para obtenção de extratos claros de fôlhas de cafeeiro é empregada a técnica para descoloração de extratos de solos descrita nos trabalhos de Chapman e Pratt (4) e Jackson (5). O objetivo desta nota é descrever o método de dosagem de nitrato nas fôlhas, com as modificações introduzidas para tornar sua marcha analítica mais simples. A marcha, da maneira apresentada, é adequada para amostras de fôlhas que não contenham excesso de cloro.

Aparelhamento — Para facilidade de execução do processo de análise é incluído o seguinte aparelhamento:

colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson, com filtro de transmissão máxima a 420 milimicross;

tubos de absorção iguais, tipo tubo de ensaio;

balança de pesagem de amostra (0,100 g);

aparelho de agitação Wrist-Action Shaker;

banho-maria para acomodar 25 copos de 50 ml;

pipetas automáticas de 20 ml e 25 ml.

Reagentes — Suspensão de carbonato de cálcio. Suspense-se 1 g de CaCO_3 em 200 ml de água destilada; hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , pó; carbonato de magnésio, MgCO_3 , pó; sulfato de cobre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, cristais finos; peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , 30%; ácido fenoldissulfônico, $\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}(\text{HSO}_3)_2$. Dissolvem-se 25 g de cristais de fenol em

(1) Trabalho feito com ajuda da Fundação Rockefeller, U.S.A., e do Instituto Brasileiro do Café, através de seu Grupo Executivo de Racionalização da Cafeicultura (GERCA). Recebido para publicação em 21 de setembro de 1964.

(2) GALLO, J. R. & COELHO, F. A. S. Diagnose da nutrição nitrogenada do milho, pela análise química das fôlhas. *Bragantia* 22: 537-548. 1963.

(3) JOHNSON, C. M. & ULRICH, A. Analytical methods for use in plant analysis. *Calif. Agric. Exp. Sta.*, 1959. p.25-78 (Bull. 766)

(4) CHAPMAN, H. D. & PRATT, P. F. *Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters*. University of California, Division of Agricultural Sciences, 1961. 309p.

(5) JACKSON, M. L. *Soil Chemical Analysis*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, Inc., 1958. 498p.

225 ml de H_2SO_4 concentrado, em um frasco pirex que se aquece em banho-maria à temperatura de 95-100°C durante 6 horas. Conserva-se a solução numa garrafa de reagente escura, bem arrolhada. Para outro método de preparo deste reagente, ver A.O.A.C. (6); hidróxido de amônio (1+9). Dilui-se 1 litro de NH_4OH concentrado com 9 litros de água destilada. A solução é dispensada com auxílio de pipeta automática de 25 ml; solução-padrão de nitrato. Dissolvem-se em água 3,61 g de KNO_3 seco e dilui-se exatamente a 500 ml. Pipeta-se uma alíquota de 5 ml desta solução e dilui-se a 1 litro, em balão volumétrico. Cada mililitro desta última solução contém 5 microgramas de N.

Método — Pesam-se 0,100 g de folha seca e moída com peneira de malha 40 e transfere-se para balões de Erlenmeyer de 50 ml. Adicionam-se, com pipeta automática, 20 ml de água destilada. Agita-se durante 15 ou 30 minutos (15 minutos para folhas finas, como as de café, e 30 minutos para materiais mais grossos, geralmente pecíolos e nervuras) e filtra-se através de papel de filtro seco. Homogeniza-se e pipeta-se 5 ml da solução para copos de 50 ml. Juntam-se 1 ml da suspensão de $CaCO_3$ e 1 ml de H_2O_2 a 30%, cobrem-se os copos com vidros de relógio, colocando-os em banho-maria com água à ebulição, para digestão durante duas horas. Decorrido esse tempo, descobrem-se os copos, que permanecem por mais uma hora no banho, ou até que o resíduo não apresente traços de peróxido de hidrogênio. Deixa-se esfriar, junta-se 1 ml do reagente fenoldissulfônico com rotação do copo, de modo que todo resíduo de sais seja coberto pelo ácido ou entre em contacto com ele. Espera-se 10 minutos. Juntam-se, depois, 25 ml de NH_4OH (1+9) medidos com pipeta automática, agita-se a solução com bastonete de vidro e procede-se à leitura em tubos colorimétricos, a 420 milimicrons.

Prepara-se uma curva de calibração com os padrões entre os limites de 0 e 40 microgramas de N. Os padrões são tratados com carbonato, sem o peróxido de hidrogênio. Uma prova em branco, em duplicata, acompanha as amostras, cujo resultado, geralmente 1 a 2 microgramas de N, é subtraído das amostras.

Discussão — Todos os reagentes necessários são testados para conter baixo teor de nitrato. No método do ácido fenoldissulfônico, a reação é desenvolvida na ausência de água. O produto formado é incolor em meio ácido e amarelo após a neutralização ou em meio alcalino.

(6) A.O.A.C. *In Methods of analysis*. Washington 4, D.C., A.O.A.C. 1955. p.574.

lino, que é obtido com um excesso de hidróxido de amônio na solução. A côr deve ser amarelo-puro; uma tonalidade parda indica oxidação incompleta da matéria orgânica.

Extratos muito coloridos, como os resultantes de fôlhas de cafeeiros, são clarificados e descoloridos com sulfato de cobre e hidróxido. O cobre é precipitado como hidróxido de cobre com hidróxido de cálcio, a frio. O excesso de hidróxido de cálcio é removido com carbonato de magnésio. No caso, a seguinte modificação é feita na extração de nitrato da amostra:

A 0,100 g de fôlha sêca e moída adicionam-se 20 ml de água destilada que contenha 0,5 ml de sulfato de cobre normal. Agita-se durante 10 minutos. Então, juntam-se 0,04 g de Ca(OH)_2 e 0,1 g de MgCO_3 , agita-se mais 5 minutos e filtra-se. O tratamento produz também um extrato alcalino, que evita perdas de nitrato durante a digestão. Efetua-se a análise de acôrdo com a marcha analítica descrita, omitindo-se a adição de carbonato de cálcio.

As quantidades de hidróxido de cálcio e carbonato de magnésio podem ser transferidas com auxílio de pequenas medidas feitas para conter, aproximadamente, os respectivos pesos. Também uma solução de trabalho de sulfato de cobre, na concentração conveniente (25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 8 litros), pode ser preparada e dispensada com pipeta automática de 20 ml. A prova em branco com sulfato de cobre é tratada como as amostras.

A precisão da análise de amostra de fôlhas com diferentes níveis de N-NO_3 e em diferentes materiais é indicada no quadro 1. Para cada amostra foram feitas nove extrações individuais e o nitrato foi dosado a partir dos extratos obtidos. LABORATÓRIO DE ANÁLISE FOLIAR, INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, E INSTITUTO DE PESQUISA IRI, SÃO PAULO.

SIMPLIFIED PROCEDURE FOR NITRATE DETERMINATION IN LEAVES, WITH PHENOLDISULFONIC ACID

SUMMARY

Leaf analyses for nitrate-nitrogen in petioles (cotton, potato) and midribs (corn, sugar cane) and in the whole leaf (coffee) are being studied as a method for evaluating the nitrogen status of these plants.

Because of its sensitivity and accuracy the nitrophenol-disulfonic-yellow color reaction was used to determine nitrates in plant material, the procedure being largely adapted from the work of Johnson and Ulrich (³). The procedure as described here is suitable for leaf samples in the absence of excess chloride.

The present method differs from the previous work in the extraction of nitrate for certain samples that give highly colored plant extracts. Clear extracts from coffee leaves are obtained by use of copper sulfate, calcium hydroxide, and magnesium carbonate, with details taken from the procedure for clarifying and decolorizing soil extracts described by Chapman and Pratt (⁴) and Jackson (⁵).

Data of Table 1 show the precision obtained on leaf samples at different levels of nitrate.

QUADRO 1. — Precisão da determinação de nitrato nas folhas. N, na amostra, em partes por milhão (ppm) sobre matéria seca

Amostra	Valores individuais			Médias	Limites de confiança 95% para uma determinação
Fólias de algodão, pecíolo (¹)	3730 3690 3500	3500 3690 3420	3500 3610 3500	3570	3460 — 3680
Fólias de batatinha, pecíolo (¹)	6490 6560 6560	6690 6690 6760	6630 6690 6490	6620	6520 — 6720
Fólias de café, folha inteira	733 744 733	716 694 705	744 716 721	723	710 — 736
Fólias de cana-de-açúcar, nervura	114 114 103	108 97 114	114 86 125	108	99 — 117
Fólias de milho, nervura	1400 1410 1420	1400 1400 1390	1410 1390 1398	1400	1390 — 1410

(¹) As leituras colorimétricas da amostra foram efetuadas sobre alíquotas de 5 ou 10 ml da solução alcalina amarela, diluídas com 25 ml de NH_4OH (1+9).