

# Avaliação de métodos químicos para determinação de nitrogênio em amostras de grãos de soja

*NARDO, A.E.<sup>1</sup>; BARZAN, R.R.<sup>1</sup>; GERMANO, M.G.<sup>2</sup>; LEITE, R.S.<sup>2</sup>; OLIVEIRA JUNIOR, A.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina-UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja; amandanardo@cnpso.embrapa.br*

## Introdução

Em amostras de tecido vegetal, quase todo nitrogênio (N) se encontra na forma orgânica, representada em maior proporção por aminoácidos e proteínas (MALAVOLTA et al., 1997). Assim, por se tratar de um elemento essencial na constituição do tecido vegetal, a determinação de N por análise química é de suma importância para avaliação da nutrição mineral de plantas. O método tradicionalmente utilizado em laboratório para determinação de N em grãos de soja é o Kjeldahl (AOAC, 1995), baseado em destilação-titulação do extrato ácido resultanteda digestão úmida em sistema aberto, onde a matéria orgânica do tecido vegetal é oxidada (mineralizada) com ácidos concentrados. Este método direto tem como princípio destilar o  $N-NH_4^+$  pela conversão à  $N-NH_3$  (Amônia) em meio fortemente alcalino. Em seguida, o  $N-NH_3$  é condensado e convertido novamente à  $N-NH_4^+$  em uma solução de  $H_3BO_3$ , sendo posteriormente titulado com uma solução de ácido forte (HCl ou  $H_2SO_4$ ) (SILVA, 2009).

Esta técnica requer uma série de processos, como a moagem dos grãos de soja, pesagem, digestão seguido de aquecimento e destilação, e finalmente a titulação das amostras. As desvantagens do processo incluem o uso de reagentes químicos em grande quantidade e, consequentemente, a geração de grande volume de resíduos, que devem ser adequadamente tratados para evitar impactos ambientais negativos.

Dentre as diversas metodologias existentes para a determinação de N, existem duas opções com potencial de utilização para substituição do método Kjeldhal, por serem rápidas e gerarem menos resíduos, sendo elas a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês, *Near-Infrared*), e o método colorimétrico, que utiliza uma solução de Azul de Salicílico (SILVA, 2009). Contudo, ambas consistem em metodologias indiretas e que devem ser adequadas e calibradas para que apresentem resultados confiáveis.

A utilização do NIR para a análise de tecido vegetal em amostras de grãos de soja pode gerar dados que sirvam como parâmetros para estabelecer critérios de avaliação em relação ao método padrão de análise de N (Kjeldahl). A grande vantagem do NIR é a leitura das amostras in-natura (método não destrutivo), não sendo necessários os processos de digestão e destilação dos extratos utilizados no método padrão de determinação de N, sem a geração de resíduos. Por outro lado, é necessário preparar uma curva de calibração que relacione a leitura do espectro e o teor de N, além de coletar grãos íntegros e devidamente limpos. Além disso, o custo de aquisição do equipamento é bastante elevado e a exatidão dos resultados, no caso da determinação de N, ainda é muito questionada.

A determinação do N pelo princípio colorimétrico (Azul de Salicílico), por sua vez, não dispensa as etapas de preparo e abertura das amostras (moagem, pesagem e digestão), mas, por se tratar de uma metodologia espectrofotométrica, apresenta a vantagem de ser de rápida execução e de gerar baixo volume de resíduos. Além disso, com a recente aquisição de um espectrofotômetro com amostrador automático, a rotina de leitura do N no Laboratório de Solos e Tecido Vegetal - LASTV da Embrapa Soja poderá ser automatizada, poupando tempo e recursos.

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de adoção de dois novos métodos de determinação da concentração de N total em grãos de soja na rotina de análise do Laboratório de Tecido Vegetal da Embrapa Soja.

## Material e Métodos

Para a comparação dos métodos avaliados foram utilizadas 54 amostras de grãos de soja coletadas durante a safra 2011/2012. Para o procedimento padrão (Kjeldahl), foi utilizada balança analítica para pesagem e tubo de digestão de 90 mL. Os reagentes usados na digestão consistiram na mistura catalítica, composta de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) e sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) a 10:1, além de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  a 130 V). Para a destilação-titulação, utilizou-se hidróxido de sódio (NaOH) a 10 mol  $L^{-1}$ , ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) a 10 g  $L^{-1}$ , além de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 0,02 mol  $L^{-1}$  para a titulação. Como equipamentos analíticos foram utilizados blocos digestores e as amostras foram analisadas em AutoKjeldahl Unit K-370 Büchi, com amostrador automático K-371 (Büchi, Switzerland).

No processo de digestão foram utilizados 0,1 g de amostra, em torno de 0,2 g da mistura catalisadora, 2,0 mL de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e 2,0 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado. Os tubos foram colocados no bloco digestor e aquecidos lentamente até 350°C ou até obtenção de um líquido viscoso esverdeado (cerca de 2 horas). Em seguida, foram acrescentados 15 mL de água deionizada em cada tubo, e os extratos diluídos foram transferidos para o equipamento AutoKjeldahl K-370 e analisados conforme o manual de operação do equipamento.

Para a análise por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) foram utilizados grãos de soja inteiros, uma cubeta de quartzo e equipamento analítico NIR – Antaris II (Termo Scientific, Califórnia - USA). Pelo fato desta análise não necessitar da moagem inicial do tecido vegetal, os grãos foram apenas colocados in natura em cubeta e analisados de acordo com instruções do fabricante, utilizando a curva de calibração ajustada e utilizada pelo responsável do Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, Londrina (Mandarino & Leite, dados não publicados).

No método colorimétrico, o processo de digestão foi o mesmo utilizado no método padrão (Kjeldhal), completando-se o volume do extrato para 50 mL (Alíquota A - diluição de 500x). Em seguida, transferiu-se 1 mL da alíquota A para tubo tipo Falcon completando-se o volume para 10 mL com água deionizada (Alíquota B - diluição de 10x). Para a curva de calibração foi preparada uma solução padrão de N de concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ , dissolvendo 4,7138 g de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  p.a. em 1.000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada. A partir desta solução, foi preparada uma solução intermediária de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de N (100 ppm). A partir da solução intermediária, foram preparados os pontos da curva com as seguintes concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$ : 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Os reagentes utilizados foram:

Solução A: solução de ácido salicílico a 5%, preparada a partir de 50 g de ácido salicílico, 50 g de citrato de Na e 21 g de NaOH em frasco de 1.000 mL completando com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada;

Solução B: solução de nitroprussiato de Na a 0,1 %, dissolvendo-se 0,2 g de nitroprussiato de Na em 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada;

Solução C: solução de NaOCl a 0,15%, diluindo-se 6 mL de NaOCl a 5% p.a. para volume final de 200 mL com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada.

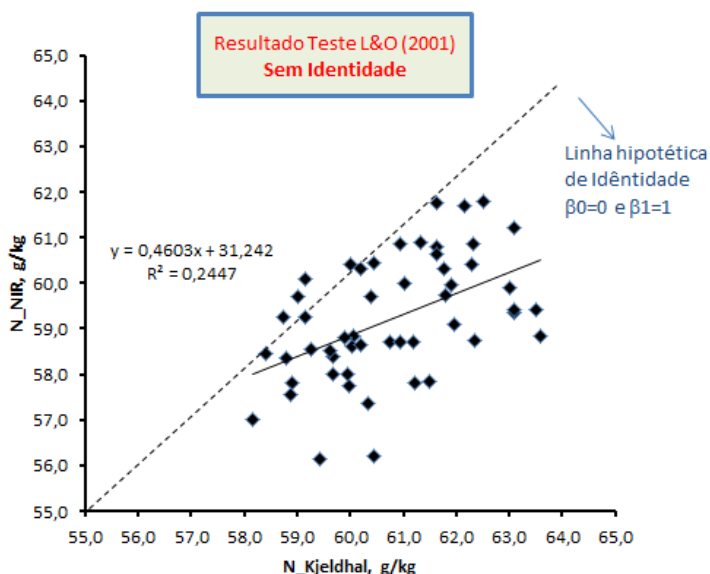
No procedimento de preparo das amostras, pipetou-se 1,0 mL da Alíquota B; 6,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 mL da solução A; 1,0 mL da solução B; e 1,0 mL da solução C, em tubo de ensaio de 15 mL. Procedimento idêntico foi realizado para os pontos da curva de calibração. Após 60 minutos, efetuou-se a leitura no espectrofotômetro UV-VIS, marca/modelo PerkinElmer/Lambda 25, a 697 nm.

Os resultados foram comparados por meio do teste de identidades de métodos propostos por Leite & Oliveira (2000). Onde não houve identidade entre os métodos, modelos de regressão linear foram ajustados para relacionar os resultados entre ambos.

## Resultados e Discussão

### Determinação de N pelo método NIR

Na Figura 1 estão apresentados os dados que relacionam a concentração de N determinada com o método padrão (Kjeldhal) e NIR. Não houve identidade entre os métodos pelo teste de Leite & Oliveira (2001), embora os valores encontrados sejam muito próximos, visto que a concentração média de N nas amostras foi de 60,8 e 59,2 g/kg, respectivamente pelos métodos Kjeldhal e NIR.

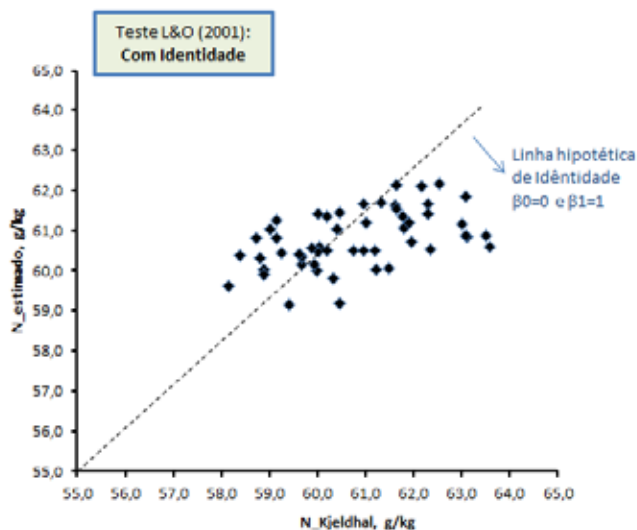


**Figura 1.** Concentração de N determinada com os métodos padrão (Kjeldhal – eixo x) e NIR (eixo y). Embrapa Soja, 2012

Uma das possibilidades a ser realizada quando não há identidade entre métodos é estimar o resultado de N em função do método mais rápido e prático (neste caso, o NIR), e verificar se tal estimativa apresenta identidade com os resultados do método padrão (Kjeldhal). Nesse sentido, foi ajustado o modelo de regressão relacionando a concentração de N pelo método padrão e a concentração de N pelo NIR. A equação utilizada para este modelo foi a seguinte:

$$N \text{ estimado} = 29,304 + 0,5317 \times N\text{-NIR}; R^2 = 0,25 \quad (\text{Eq. 1})$$

Para verificar a estimativa da concentração de N, foi necessário compará-la com a concentração de N obtida com o método de referência, sendo esta comparação apresentada na Figura 2. Observou-se, portanto, que a estimativa do N com a Eq.1 apresentou identidade com os resultados do Kjeldhal, o que possibilita o uso do NIR para determinação da concentração de N em amostras de grãos de soja, sem comprometimento dos resultados analíticos.



**Figura 2.** Concentração de nitrogênio estimada em função da leitura com o NIR (eixo y) em comparação com a determinação com o método padrão (Kjeldhal – eixo x). Embrapa Soja, 2012

### Determinação pelo Método Colorimétrico

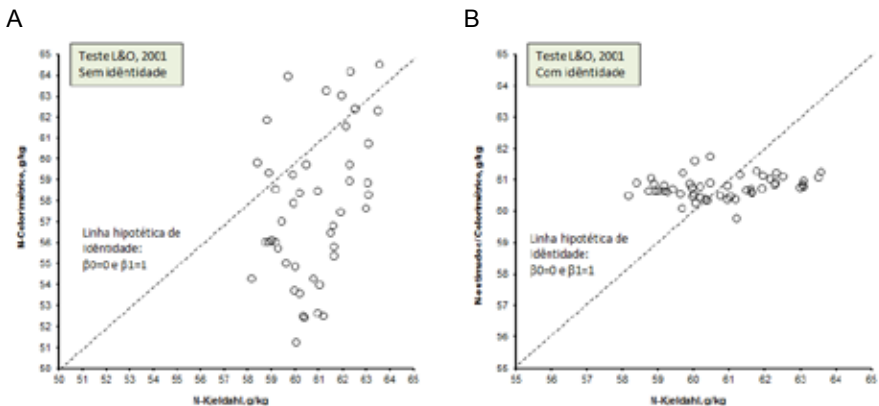
A determinação dos teores de N por meio do método colorimétrico também não apresentou identidade com o método de referência quando considerados os dados de cada método (Figura 3A). Contudo, assim como foi verificado com a utilização do NIR, ao ajustar-se um modelo de regressão linear com intuito de estimar o N em função do resultado do método colorimétrico, foi possível obter resultados de N estatísti-

camente semelhantes aos obtidos com o método padrão (Figura 3B). Dessa forma, a equação ajustada para estimar a concentração de N foi a seguinte:

$$N \text{ estimado} = 56,53 + 0,0732 \times N \text{ colorimétrico}$$

Para este método, outra opção seria a utilização de uma equação que relacionasse a concentração de N em função da leitura do espectrofotômetro, dada em absorbância. Esta opção tem a vantagem de eliminar o preparo da curva de calibração, podendo-se ler diretamente as amostras e posteriormente converter os resultados de absorbância para g/kg de N. Como se trata do mesmo conjunto de dados, esta estimativa também apresenta resultados estatisticamente semelhantes aos do Kjeldhal. Portanto, o modelo ajustado para estimativa dos resultados foi o seguinte:

$$N \text{ estimado} = 56,413 + 4,7664 \times \text{Absorbância}$$



**Figura 3.** Concentração de nitrogênio nas amostras de grãos de soja: A. comparação entre os valores determinados com o método padrão (Kjeldhal, eixo x) e o método colorimétrico (eixo y); B. comparação entre os valores estimados em função da leitura com o método colorimétrico (eixo y) em comparação com os valores determinados com o método padrão (Kjeldhal – eixo x). Embrapa Soja, 2012

## Conclusões

Ambos os métodos avaliados podem ser utilizados alternativamente ao método padrão, desde que se utilizem equações para estimar a concentração de N. No caso do NIR, o método se limitaria à determinação de N em amostras de grãos somente, devido à necessidade de curva de calibração. Já o método colorimétrico, teoricamente, pode ser adotado para outros materiais vegetais, desde que os resultados sejam devidamente correlacionados aos obtidos com o Kjeldhal.

## Referências

LEITE, H.G.; OLIVEIRA, F.H.T. Statistical Procedure to Test the Identity of Analytical Methods. Communications in Soil Science and Plant Analysis, New York, v.33, n.7-8, 2001.

SILVA, F.C. da, org. Análise química de tecido vegetal. In: Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.p.193-204.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. Funções. In: Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba – São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. 67p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16 ed. Arlington: AOAC, 1995, v. 1.