

COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE ANÁLISE QUÍMICA UTILIZANDO GRAMA BERMUDA (*Cynodon dactylon*) COMO MATRIZ ANALÍTICA

NOBILE, Fabio Olivieri de¹
NUNES, Hugo Dias²
SANTOS, Priscila Paula Furegate³
FERRANTI, Carolina Costa³
NAKAMURA, Aline da Silva³

Recebido em: 2014. 02.10

Aprovado em: 2014. 07.14

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1057

RESUMO: Este trabalho foi realizado com objetivo de conhecer a eficiência dos procedimentos de análise foliar e de raiz, através da comparação de três metodologias para a quantificação de potássio, sódio e fósforo. Os métodos avaliados foram a digestão via seca em cadinhos de porcelana, digestão nitro-perclórica e extração via úmida com ácido clorídrico. As amostras foram coletadas no setor de agronomia no Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, e analisadas no laboratório de solos da mesma entidade. Analisaram-se amostras da grama-bermuda (*Cynodon dactylon*), enriquecida com lodo de esgoto. Na avaliação do método digestão via seca em cadinhos de porcelana obteve-se melhor sensibilidade para leitura do potássio na raiz da planta; na metodologia via úmida nitro-perclórica obteve-se melhor resultado para fósforo tanto na parte aérea quanto na raiz, também para o potássio na parte aérea e para o sódio na raiz; a extração via úmida em ácido clorídrico obteve-se um bom resultado do sódio na parte aérea.

Palavras-chave: Análise química. Modelo biológico. Metodologia

SUMMARY: This study was conducted to provide effective procedures for leaf and root analysis, the study aimed to compare three methods for chemical analysis to quantify foliar potassium, sodium and phosphorus. The methods tested were dry digestion in porcelain crucibles, nitro-perchloric digestion and extraction wet with hydrochloric acid. The samples were collected in the field of agronomy at the University Center of the Educational Foundation of Barretos, and analyzed in the soil laboratory of the same entity. We analyzed samples of Bermuda-grass (*Cynodon dactylon*), enriched with sewage sludge. In the evaluation method for the digestion dry in porcelain crucibles, it was possible to obtain better sensitivity for reading potassium in the plant root; methodology wet nitro-perchloric a better result was obtained for phosphorus both in shoots and in roots, also for potassium in shoots and sodium in the root; wet extraction in hydrochloric acid showed a good result of the sodium in the shoot.

Keywords: Chemical analysis. Biological model. Methodology.

INTRODUÇÃO

Um aspecto importante da caracterização química das folhas está relacionado com o uso dos teores de nutrientes neste tecido vegetal para diagnosticar o estado nutricional das plantas. Entre os vários fatores que podem afetar estes teores, estão os procedimentos metodológicos de análise química (BATAGLIA; SANTOS, 2001).

O método empregado depende dos objetivos do estudo, dos elementos ou compostos a serem analisados e, inclusive, das potencialidades do laboratório (JONES JUNIOR; CASE, 1990), da simplicidade, do custo e da segurança operacional (MIYASAWA *et al.*, 1984).

¹Professor Doutor da Fundação Educacional de Barretos-UNIFEB. Rua Professor Roberto Frade Monte, 385, Barretos, SP. CEP=14783-226. E-mail: fonobile@feb.br

²Acadêmico em Engenharia Agrônoma da Fundação Educacional de Barretos. Rua Professor Roberto Frade Monte, 385, Barretos, SP. CEP=14783-226.

³Acadêmico em Engenharia Química da Fundação Educacional de Barretos. Rua Professor Roberto Frade Monte, 385, Barretos, SP. CEP=14783-226.

A avaliação do estado nutricional de plantas é uma importante ferramenta para a adequada utilização de fertilizantes e tem como principal objetivo identificar os nutrientes que limitam o crescimento, desenvolvimento, produção e qualidade do produto (NOBILE et al., 2013).

A diagnose de tecido vegetal, é vital para se obter êxito na agricultura moderna e competitiva, pois, além de interferir no aspecto produtivo e qualitativo, a nutrição afeta o crescimento vegetal, a tolerância a pragas e doenças, dentre outros (NATALE, 2009).

Mesmo com as dificuldades que ainda existem na interpretação dos resultados, a diagnose foliar vem se desenvolvendo, apresentando algumas aplicações definidas, e outras, que se delineiam como promissoras, destacando-se o levantamento do estado nutricional de culturas e a confirmação de sintomas visíveis de deficiência de nutrientes, determinando os níveis dos diferentes elementos minerais nas folhas, obtendo, dessa forma orientação para a correção da fertilidade do solo e estudo do efeito das adubações de solo e foliar (EMBRAPA, 2004).

A amostragem é a fase onde ocorrem os erros que mais dificultam a interpretação dos resultados da análise foliar. Há necessidade de padronização para minimizar os efeitos dos diversos fatores que afetam a composição das folhas. A maior precisão é obtida por meio de amostras compostas, onde plantas distribuídas pela área são amostradas e as folhas são juntadas. Amostras seletivas de plantas individuais são utilizadas para finalidades específicas (MALAVOLTA et al., 1997).

De acordo à metodologia de análise química de folhas, deve-se seguir corretamente o preparo da amostra, como lavagem, secagem e armazenamento, para obter o material vegetal adequado que será encaminhado para análise. Após lavagem do material vegetal, é preciso realizar a sua secagem, para evitar a degradação e alterações químicas dos tecidos durante o armazenamento, e também para facilitar a moagem das amostras além de ser necessário para a determinação da matéria seca (PRADO, 2008).

Um dos maiores entraves à maior utilização da análise química de folhas é a falta de um método capaz de proporcionar diagnósticos eficientes. O termo “diagnóstico eficiente” diz respeito à forma prática de obterem conclusões verdadeiras das condições nutricionais e dos tratamentos a serem realizados nas mesmas, prioritariamente, no mesmo ano agrícola (CRESTE et al., 1999).

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho comparar três métodos de análise de tecido vegetal: digestão via seca em cadinhos de porcelana, digestão via úmida nitro-perclórica e extração via úmida com HCl 1 mol.L⁻¹. Na determinação dos teores de fósforo (P), potássio (K) e sódio (Na) em amostras de folha e raiz em grama-bermuda (*Cynodon dactylon*).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou um vaso de 8 L para a plantação da grama bermuda (*Cynodon dactylon*), durante o cultivo a grama recebeu doses crescentes de lodo de esgoto como fonte de nutriente. Para a análise foi utilizado à raiz e parte aérea, estas ficaram por três dias na estufa a uma temperatura de 60 a 65 °C. Após este período as amostras foram retiradas da estufa e moídas ficando pronta para os procedimentos.

O lodo de esgoto foi utilizado como fonte de nutrientes para a grama bermuda (*Cynodon dactylon*). Foi estudada a resposta da nossa amostra com diferentes doses de lodo de esgoto durante seu crescimento. As amostras foram submetidas às seguintes metodologias analíticas: Digestão via seca em cadinhos de porcelana (PERKIN; ELMER, 1973); Digestão nitro-perclórica (SANTOS, 2009) e Extração via úmida com HCl 1 mol L⁻¹ (MIYASAWA; PAVAN; BLOCK, 1984).

Digestão via seca em cadinhos de porcelana

Para o ensaio de digestão via seca em cadinhos de porcelana (PERKIN; ELMER, 1973) pesou-se 1,000 g (+/- 0,0010) de material seco moído da amostra diretamente dentro de cadinhos de porcelana. Os cadinhos foram levados ao forno-mufla ainda frio, sendo a temperatura gradativamente elevada à 600°C. Após alcançada a temperatura os cadinhos permaneceram por aproximadamente 3 horas. O esfriamento ocorreu naturalmente.

Foram adicionadas 5 gotas de HCl 3 mol L⁻¹ a cada cadinho, para auxiliar na decomposição. Em seguida, os cadinhos retornaram ao forno-mufla por mais 3 horas, para assegurar a completa decomposição do material. A cor a ser alcançada no material é cinza-claro, como ainda foi observado a presença de material não completamente oxidado, foi necessário a adição de 0,5 mL de HCl concentrado, e retornou-se ao forno-mufla por mais 3 horas. Após o resfriamento, foram adicionados 10 mL de HCl 3 mol L⁻¹ e aquecimento em placa aquecedora à 80°C por 15 minutos, para a completa solubilização das cinzas. Cuidados foram tomados para evitar a fervura da solução. O próximo passo foi a filtragem da solução com papel filtro (JP 42 Quanty 15 cm – Cinza 0,007) em balões volumétricos de 100 mL, completando o volume com água deionizada. A solução foi transferida para frascos próprios de acondicionamento, estando apta à leitura.

Digestão nitro-perclórica

Para a realização do ensaio da digestão nitro-perclórica (SANTOS, 2009), pesou-se 0,5000 g à 0,5050 g da amostra seca e moída. Transferiu-se para tubos de digestão de capacidade aferido para 50 mL, adicionou-se 3 pérolas de vidro em cada tubo, e acrescentou 5 mL de HNO₃ 65% m/v. Deixando a temperatura ambiente por uma noite. A seguir colocou-se os tubos em um bloco de digestor, aquecendo à temperatura de 80 °C por 20 minutos, e depois aumentando para uma temperatura de 160°C, até a evaporação da solução. Observando cuidadosamente para o material não subir pelas paredes do tubo de digestão. Quando a maior parte do HNO₃ evaporou e a solução tornou-se clara, ou seja, o gás castanho da parede do tubo acabou, retirou-se os tubos do bloco e esperou esfriar, acrescentado 1,3 mL de HClO₄ concentrado. Os tubos foram colocados novamente no bloco digestor, aumentando a temperatura para 210°C. A digestão foi completada quando obteve uma solução incolor e apareceu uma fumaça densa branca de HClO₄.H₂O acima do material dissolvido dentro do tubo. Após a completa digestão os tubos foram resfriados naturalmente, e as amostras diluídas com H₂O para 25 mL no vidro snap-cape.

Extração via úmida em HCl 1 mol L⁻¹

Para o ensaio de extração via úmida em HCl 1 mol L⁻¹ (MIYASAWA; PAVAN; BLOCK, 1984), pesou-se 0,5000 g (+/- 0,0010) de material de amostra previamente seco e moído diretamente em balões volumétricos de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 25 mL de HCl 1 mol L⁻¹ a cada balão volumétrico e obtido o peso. Os balões com as amostras foram aquecidos por 15 minutos em placa aquecedora à temperatura de 80°C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o peso foi reajustado ao peso inicial com água deionizada, devido a possíveis evaporações de HCl. A seguir, as amostras foram submetidas a um agitador horizontal por 50 minutos. As amostras foram filtradas em papel filtro (Framex quantitativo 15 cm – 389³ - liberação lenta) e acondicionadas em frascos apropriados, estando em condições de leitura.

Determinação dos elementos na amostra diluída

Fósforo

Para fósforo, pipetou-se 1 mL da amostra, transferiu-se para um tubo de ensaio, adicionou-se 4 mL de água, 2 mL do reativo (mistura de partes iguais de molibdato de Amônio 5% e Vanadato 0,25%),

agitou-se e esperou por 15 minutos e leu no Espectrofotômetro UV-VIS (Analyser 910) a 420 nm. O aparelho foi calibrado com 5 mL de H_2SO_4 5 mol L^{-1} e 2 mL do reativo.

Soluções

H_2SO_4 5 mol L^{-1} : Diluiu-se 280 mL de ácido sulfúrico para um balão de 1 L, completou-se com H_2O até o menisco.

Molibdato de Amônio 5%: Dissolveu-se 50 g de $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ em 800 mL de água quente, esfriou e completou para 1 L com H_2O até o menisco.

Vanadato 0,25%: Dissolveu-se 2,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{VO}_3$ em 500 mL de água quente e adicionou-se 350 mL de HNO_3 65%, esfriou e completou para 1 L com H_2O até o menisco.

Curva padrão para o P

A solução estoque de fósforo (80 mg L^{-1} de P): em um balão volumétrico de 1000 mL contendo cerca de 300 mL de água destilada e 10 mL de H_2SO_4 5 mol L^{-1} adicionou-se 0,35 g de KH_2PO_4 (fosfato monobásico ou biácido de potássio) seco em estufa por 2 horas a 70/80°C e resfriado em dessecador. Agitou-se e completou-se o volume com H_2O destilada.

Solução Padrão de fósforo: em balões volumétricos de 100 mL adicionou-se através de uma bureta: 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 mL da solução estoque de P (80 mg L^{-1}), 4,0 mL de H_2SO_4 5 mol L^{-1} , completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Essa solução continha 0,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20, mg L^{-1} de P.

Para obtenção da curva padrão, pipetou-se 5 mL dos padrões para tubo de ensaio, adicionou-se 2 mL do reativo colorido e homogeneizou-se deixou em repouso por 5 minutos e leu em colorímetro utilizando filtro azul, ou seja, absorvância de 420 nm.

Potássio

Para determinação do teor, pipetou-se 1 mL do extrato, transferiu-se para tubo de ensaio e adicionou-se 9 mL de água e agitou-se. Calibrou o fotômetro de chama com a solução-padrão com o zero mg L^{-1} e ajustou-se para 80 com solução padrão com 40 mg L^{-1} efetuou a leitura.

Soluções

Solução de K 100 mg L^{-1} : Pipetou-se 10 mL da solução de 1000 mg L^{-1} de K e transferiu-se para um balão de 100 mL e completou com água.

Solução de HNO_3 0,1 mol L^{-1} : transferiu-se 3,49 mL para um balão de 1 L contendo 500 mL de água e completou-se até o menisco.

Padrão 80 mg L^{-1} : 12 mL de HNO_3 0,05 mol L^{-1} e 8 mL de K 100 mg L^{-1} .

Padrão 0 mg L^{-1} : HNO_3 0,05 mol L^{-1} .

Sódio

Para determinação do teor, pipetou-se 1 mL do extrato para um tubo e adicionou-se 9 mL de água e agitou. Ajustou o fotômetro de chama com a solução padrão de Na 0 e 40 mg Na/L e efetuou-se a leitura.

Soluções

Solução de Na 1000 mg L^{-1} : Dissolveu-se 2,52 g de NaCl (seco a 105°C por uma hora), em 500 mL de água e completou-se o volume até 1000 mL de H_2O .

Solução de Na 100 mg L^{-1} : Pipetou-se 10 mL da solução de 1000 mg L^{-1} de Na e transferiu-se para

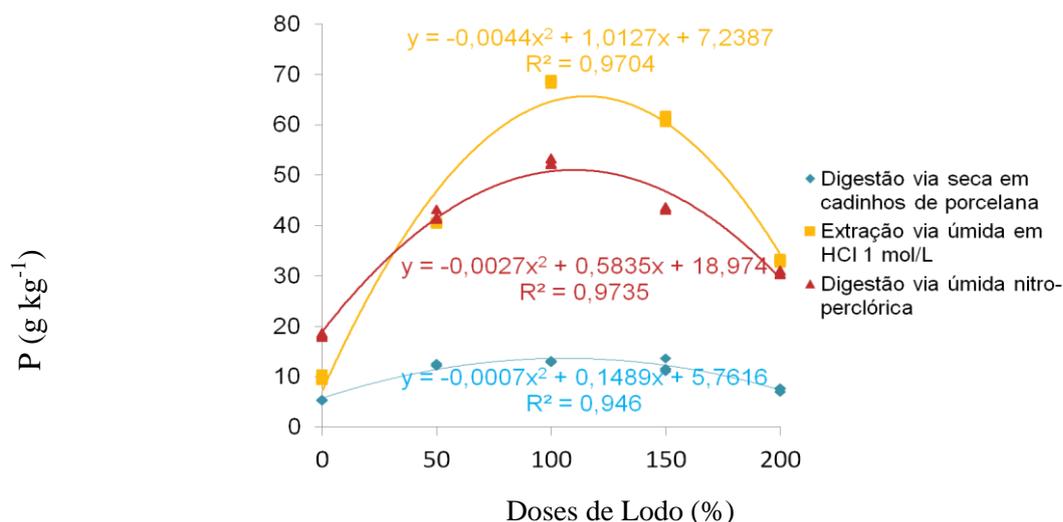
um balão de 100 mL.

Solução de HNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$: Transferiu-se 3,49 mL para um balão de 1 L contendo 500 mL de água e completou-se até o menisco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

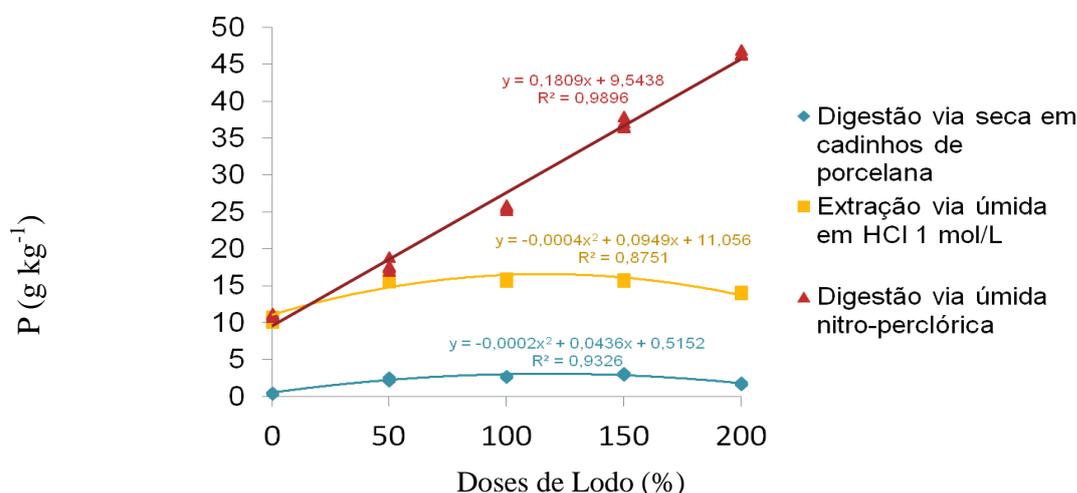
Para o nutriente fósforo, a metodologia digestão nitro-perclórica detectou uma maior quantidade de fósforo ($R^2 = 0,97$), significando 97 % de variância verificada na parte aérea da planta conforme a Figura 1 abaixo, tendo a digestão via seca em cadinhos de porcelana com uma menor detecção de fósforo.

Figura 1. Doses de lodo de esgoto nos teores de fósforo na parte aérea, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



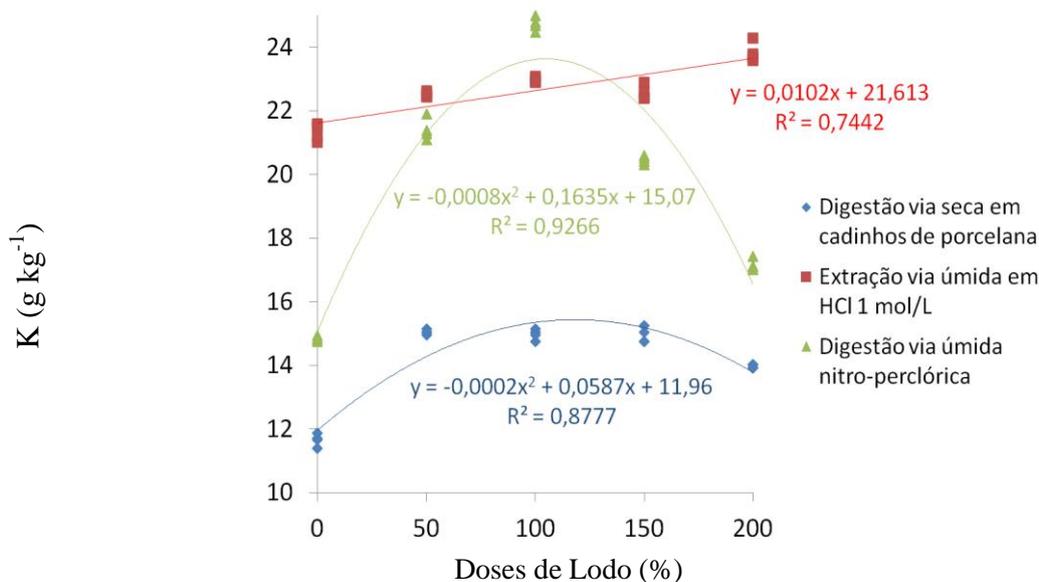
Enquanto na raiz a digestão nitro-perclórica se encontra com uma maior variância ($R^2 = 0,99$) mostrando-se a digestão via seca superior ao método digestão via úmida (Figura 2) tanto na parte aérea quanto na raiz da planta.

Figura 2. Doses de lodo de esgoto nos teores de fósforo na raiz, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



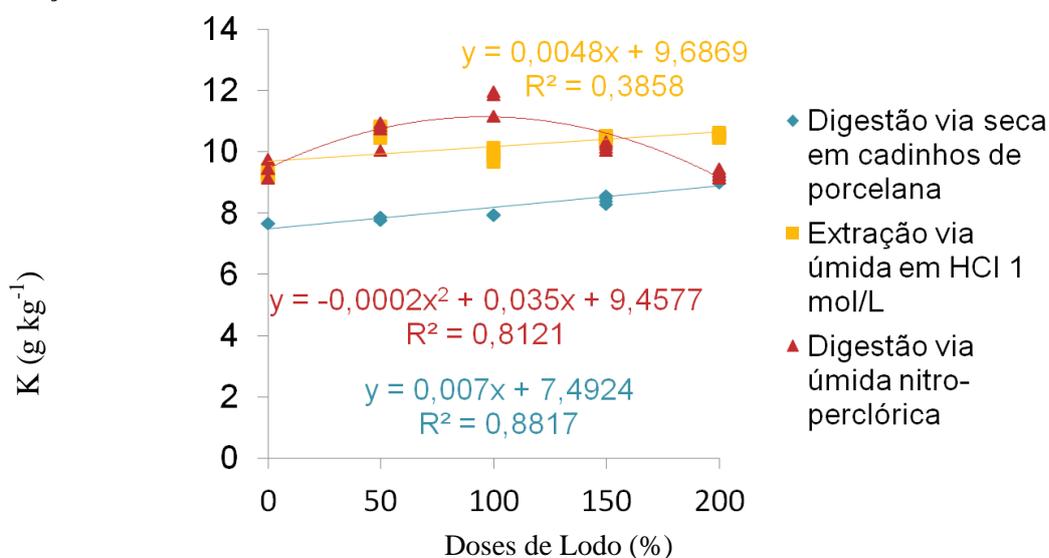
Para o nutriente potássio, (Figura 3) a parte aérea obteve um maior coeficiente de determinação de potássio na metodologia digestão nitro-perclórica ($R^2 = 0,93$), seguido da digestão via seca em cadinhos de porcelana ($R^2 = 0,88$) e extração via úmida em HCl 1 mol L⁻¹ ($R^2 = 0,74$).

Figura 3. Doses de lodo de esgoto nos teores de potássio na parte aérea, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



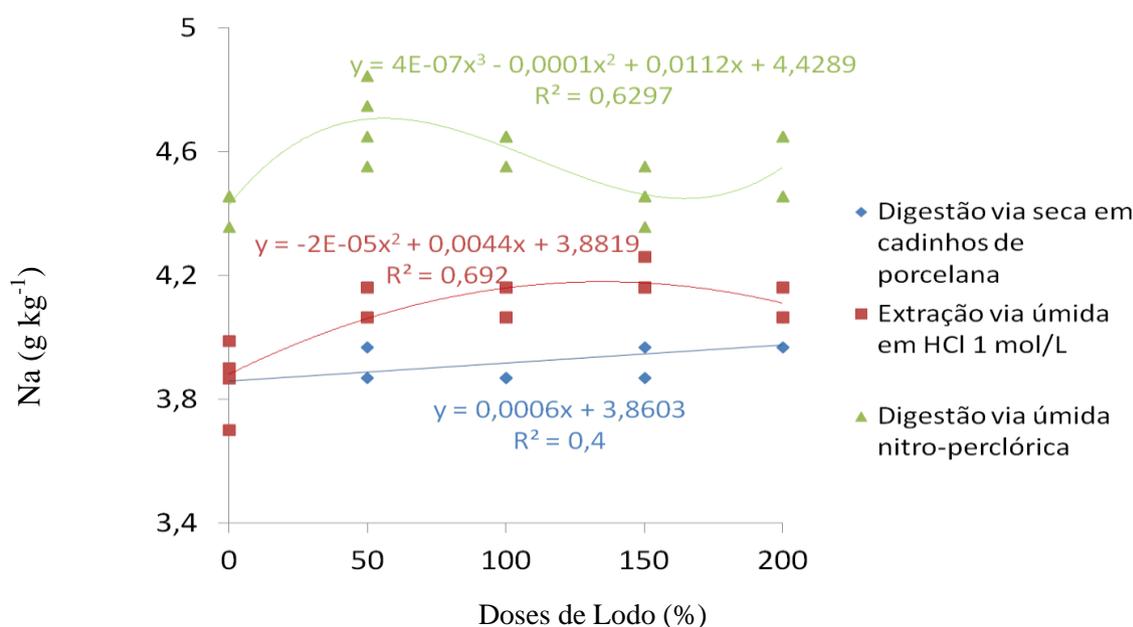
Na raiz (Figura 4) a digestão via seca em cadinhos de porcelana determinou melhor coeficiente de potássio ($R^2 = 0,88$). Tendo extração via úmida em HCl 1 mol L⁻¹ com um menor coeficiente, tendo uma significativa diferença.

Figura 4. Doses de lodo de esgoto nos teores de potássio na raiz, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



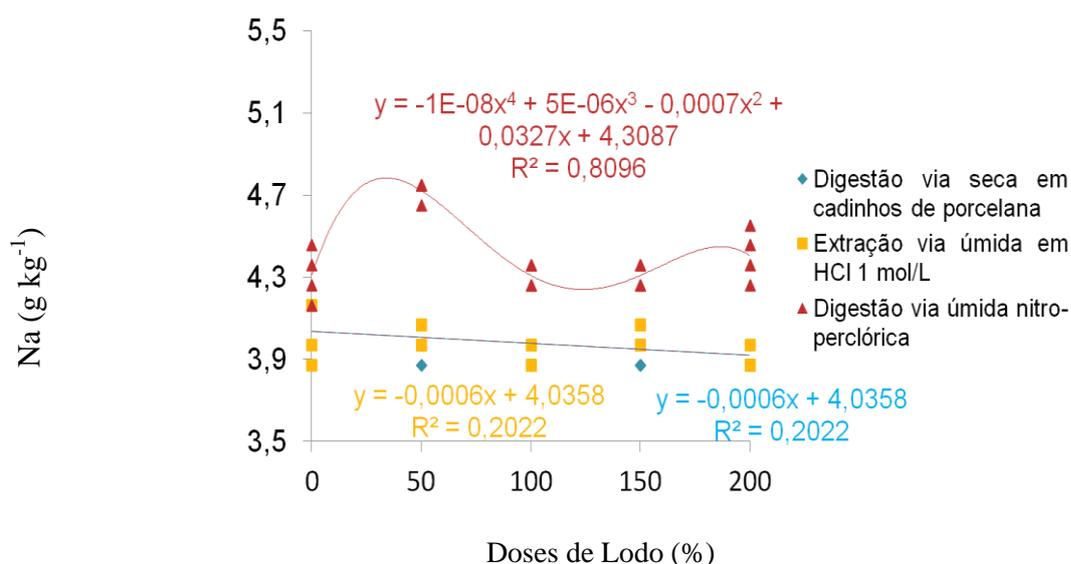
Para determinar o coeficiente do sódio na parte aérea (Figura 5) se obteve um melhor coeficiente para extração via úmida HCl 1 mol L⁻¹ ($R^2 = 0,69$).

Figura 5. Doses de lodo de esgoto nos teores de sódio na parte aérea, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



Na raiz (Figura 6) a digestão nitro-perclórica ($R^2 = 0,81$) detectando uma maior quantidade de sódio, mostrou uma diferença significativa comparado a digestão via seca em cadinhos de porcelana e extração via úmida em HCl 1 mol L⁻¹.

Figura 6. Doses de lodo de esgoto nos teores de sódio na raiz, determinado em função de metodologias de extração. Barretos – SP, 2014



Cabe ao analista saber identificá-las e conhecê-las, para que a opção por um determinado método seja a mais coerente possível, tendo todo e qualquer método para análise de tecidos suas limitações. Bataglia e Santos (2001) referem-se às digestões seca e úmida como fontes de erro comum nos processos de determinação, devido à liberação incompleta de elementos e/ou contaminação das amostras.

De acordo com Anderson e Henderson (1988), alguns métodos de digestão são mais eficientes que outros, mas a eficiência da digestão em todos dependerá muito do tipo de tecido digerido. Segundo Carneiro et al. (2006), a incineração seca pode resultar em perdas de elementos voláteis, enquanto que a

digestão úmida pode produzir amostras em branco com valores altos de elementos, devido às impurezas de ácidos e catalisadores algumas vezes utilizados. Enquanto que as técnicas de extração podem não extrair de forma adequada os elementos desejados da porção orgânica.

As variações dos elementos podem influenciar negativamente quanto positivamente no resultado. Tanto que a máxima concentração de um elemento não quer dizer que o método é superior em relação aos demais, nem que ele seja o mais indicado para obtenção do elemento.

Os elementos analisados sofrem algum tipo de interferência, mesmo desprezível, durante as determinações. Afetando a formação de átomos livres na chama e afetando também o grau de absorção e emissão espectral dos átomos.

Difícilmente podem-se determinar as vantagens e desvantagens dos métodos caracterizando a superioridade de um ou de outro sobre os demais. Deve-se então, utilizar sempre que possível mais de um método para determinação química e optar por aquele que mais se aproxima dos resultados adequados, evitando tendência de resultados sem a devida exatidão ou variação.

Digestão nitro-perclórica

Para aumentar os limites de detecção e a precisão analítica no emprego da digestão com $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, Zasoski e Bureau (1977) sugeriram a digestão de 3 g de amostra. Tendo como inconveniente uma maior demanda de ácido por amostra. Wikoff e Moraghan (1986) comentam que a sílica presente em materiais orgânicos diminui a eficácia da digestão úmida, sugerindo HF para completa digestão de silício, porém, com o uso de HF não é possível a utilização de vidro, sendo que a digestão nitro-perclórica é feita em tubos digestores.

A maioria dos laboratórios, utiliza a combinação de HNO_3 e HClO_4 segundo Boeger, Wisniewski e Reissmann (2005) na digestão via úmida, assim como nesse trabalho. A efetividade da digestão nitro-perclórica em digestões é amplamente comprovada (ZASOSKI; BURAU, 1977; SMITH, 1965), sua utilização só não é maior devido aos perigos no manuseio dos ácidos, principalmente do HClO_4 .

Digestão em cadinhos de porcelana

A temperatura utilizada no método (600°C) foi constante para todas as amostras mufladas. Testando em diferentes temperaturas Isaac e Jones Jr (1972) concluíram que a temperatura de 400°C não promove a completa decomposição do material. Baetz e Kenner (1973) sugerem a inutilização de amostras que não foram completamente oxidadas, devido à presença de possíveis complexos formados com alguns metais, principalmente na presença de cobalto. Já os procedimentos via seca (cadinho de porcelana) proposto nesse trabalho utilizaram-se da requeima para assegurar a completa oxidação de alguns dos materiais junto com a utilização de mais HCl, verificada em todas as amostras conforme Perkin-Elmer (1973).

Extração em $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$

Além da concentração do ácido, as variáveis tempo e temperatura de extração, são responsáveis diretas pelo sucesso da solubilização. Neste trabalho o aquecimento das amostras foi realizado em temperatura de 80°C por 15 minutos, também com reajustes de volume devido à vaporizações do ácido. Miyasawa, Pavan e Block (1984), realizaram extrações de P, K com HCL, aquecendo à temperatura de 80°C por 15 minutos, também com reajustes de volume.

Outras temperaturas e tempos de aquecimento foram avaliados por Miyasawa, Pavan e Block (1984), contudo, a temperatura de 80°C por 15 minutos foi considerada a mais efetiva; razão essa para que fosse utilizada pelos métodos de extração estudados neste trabalho.

Relações entre métodos

A variabilidade de determinado método em relação a outro, as distorções que caracterizam tal relação, como também o grau de aplicabilidade dos processos envolvidos a partir da avaliação das relações entre os métodos.

Através de uma equação ($y = ax \pm b$) a regressão possibilita a obtenção de uma variável em função de outra (EZEKIEL; FOX, 1970), de acordo com o grau de confiabilidade da reta representado pelo coeficiente de correlação. Correlações e regressões possuem identificação matemática, porém os aspectos estáticos fornecidos são diferentes (BARBOSA, 1969). As equações de regressão têm sua precisão e confiabilidade aumentadas proporcionalmente ao aumento dos coeficientes de determinação e correlação.

As análises da grama bermuda para K, P e Na foram divididas em parte aérea da planta e raiz, para uma melhor análise.

O melhor coeficiente de determinação foi obtido por P ($R^2 = 0,94$) na raiz da grama bermuda, conforme Ezekiel e Fox (1970) significa que 94% de correlação verificada na digestão nitro-perclórica.

CONCLUSÕES

O método de digestão via úmida nitro-perclórica é mais sensível na detecção do fósforo na planta na parte aérea e para o potássio na parte aérea da planta.

A digestão via seca em cadinho de porcelana é eficiente na detecção do potássio na raiz.

A extração com ácido clorídrico é mais sensível para o sódio na parte aérea e a nitro-perclórica para sódio na raiz.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D.L.; HENDERSON, L.J. Comparing sealed chamber digestion with other digestion methods used for plant tissue analysis. **Agronomy Journal**, vol. 80, n°3, Clewiston, p. 549-552, 1988.

BAETZ, R.A.; KENNER, C.T. Determination of heavy metals in foods. **Journal Agr. Food Chem**, vol. 21, n°3, Dallas, p 436-440, 1973.

BARBOSA, R.M. **Estatística elementar - estatística descritiva** v. 1, São Paulo, 1969.

BATAGLIA, O. C.; SANTOS, W. R. dos. Estado nutricional de plantas perenes: avaliação e monitoramento. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n. 96, p. 1-8, dez. 2001.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C.; REISSMANN, C. B. Nutrientes foliares de espécies arbóreas de três estádios sucessionais de floresta ombrófila densa no sul do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 167-181, 2005.

CARNEIRO, C.; REISSMANN, C. B.; MARQUES, R. Comparação de métodos de análise química de Ca, Mg e Al em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 113-122, 2006.

CRESTE, J. E.; NAKAGAWA, J.; GRASSI FILHO, H. Uso do DRIS no manejo da adubação em pomares cítricos. In: SIMPÓSIO DE MONITORAMENTO NUTRICIONAL PARA A RECOMENDAÇÃO DA ADUBAÇÃO DE CULTURAS, 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: POTAFOS, 1999. 1CD-ROM.

EMBRAPA, Comunicado Técnico – Amostragem de plantas para análise química, 2004. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/696667/1/com.tec.121.pdf>>. Acesso em: 01/fev/2014.

EZEKIEL, M.; FOX, K.A. **Methods of correlation and regression analysis**, 1970.

ISAAC, R.A.; JONES JR, J.B. Effects of various dry ashing temperatures on the determination of 13 nutrient elements in five plant tissues. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 3(3), p. 261-269, 1972.

JONES JUNIOR, J. B.; CASE, V. W. Sampling handling, and analyzing plant tissue samples. In: WESTERMAN et al. (Eds.). *Soil testing and plant analysis*. Madison: SSSA Book, 1990. p. 389-427. (Series, 3).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MIYASAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCK, M.F.M. Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method. **Commun. Soil Science and Plant Analysis**; v. 15(2), p.141-147, 1984.

NATALE, W. 2009. Adubação, nutrição e calagem na goiabeira. In: Natale, W.; Rozane, D. E.; Souza, H. A.; Amorim, D. A. (Eds). **Cultura da goiaba do plantio à comercialização**. FCAV/Capes/ CNPq/ FAPESP/Fundunesp/SBF, Jaboticabal, Brasil, p.257-280.

NOBILE, F. O.; GALBIATTI, J. A.; MURAISHI, R. I. Micronutrientes no solo irrigado com água servida e na planta de cana-de-açúcar fertilizada com resíduos orgânicos e industriais. **Holos Environment**, Rio Claro, n.1, v. 13, p. 53-63, 2013.

PERKIN-ELMER Corporation. **Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry**. Norwalk, 1973.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. São Paulo: UNESP, 2008. 407 p.

SANTOS, A.D.dos et al. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2009. 624 p

SMITH, G.F. **The wet chemical oxidation of organic compositions employing perchloric acid (with or without added HN03 - H5I06 - H2S04)**. Ohio, 105 p.,1965.

WIKOFF, L.R.; MORAGHAN, J.T. Determination of plant iron, manganese and zinc by wet ashing procedures. **J. Sci. Food Agric.**, v. 37, p. 839-844, 1986.

ZASOSKI, R.J.; BURAU, R.G.A rapid nitric-perchloric acid digestion method for multielement tissue analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 8(5), p 425-436, 1977.