

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 21

Campinas, abril de 1962

N.º 25

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ALUMÍNIO EM PLANTAS¹

J. ROMANO GALLO, *engenheiro-agrônomo, Laboratório de Pesquisas de Elementos Minerais em Plantas, Instituto Agrônomo*

RESUMO

Um método rápido e sensível espectrofotométrico de determinação do sistema alumínio-hematoxilina pode ser usado para se conhecer o teor de alumínio em tecidos de plantas. Este trabalho descreve o método analítico com modificações introduzidas, estuda as interferências e inclui sua adaptação para plantas. Depois da incineração do material orgânico, o alumínio é dosado usualmente numa alíquota do extrato de cinzas equivalente a 0,005 a 0,020 g de material seco. A cor é obtida em condições controladas de pH com solução *buffer* de acetato e alcalinização com carbonato de amônio. No processo podem ser determinadas, rapidamente, pequenas quantidades de alumínio, sem interferência de outros elementos, nas concentrações que usualmente ocorrem nas plantas.

1 — INTRODUÇÃO

O alumínio não está incluído no grupo de elementos essenciais às plantas, não tendo sido relatados na literatura sintomas de deficiência motivados pela falta do mesmo (2). Entretanto, sua importância advém do efeito tóxico que apresenta, quando ocorre em excesso na forma solúvel, constituindo-se em um fator limitante ao crescimento de certas plantas. O estudo de método sensível, preciso e rápido para sua determinação, representa interesse na investigação dos níveis de alumínio nos tecidos vegetais.

A hematoxilina tem sido usada com sucesso na determinação colorimétrica de pequenas quantidades de alumínio em água (3, 4). Mellan (6), Sandell (7) e Snell e Snell (8) fazem referências pertinentes à dosagem do alumínio pela hematoxilina. Mais recentemente descrição de método para a determinação do alumínio em compostos de urânio é dada por Basset e Tomkins (1).

¹ Recebido para publicação em 2 de março de 1962.

Em condições definidas, o corante orgânico é adsorvido ao hidróxido de alumínio que se forma e dá uma laca de côr violeta-avermelhada. A absorvência do composto colorido fornece uma linha reta de conformidade com a lei de Beer. O ferro interfere ainda que em concentração de 0,01 ppm (4). Sua sensibilidade à hematoxilina é menor do que a do alumínio (1). Entretanto, como é comum e essencial a ocorrência de ferro nas plantas, êsse elemento representa séria objeção ao método, se não fôr separado.

O presente trabalho estuda o método analítico com referência às propriedades colorimétricas, efeitos de íons na absorvência do complexo de alumínio e sua adaptação para plantas. O processo de separação com base na diferença de absorvência dos complexos alumínio e ferro-hematoxilina, em dois comprimentos de onda diferentes, proposto por Knudson, Meloche e Juday (4) é aplicado ao método aqui descrito.

2 — MÉTODO DE ANÁLISE

Reagentes — Água destilada desmineralizada.

Ácido clorídrico, aproximadamente 0,1 N.

Ácido acético, 6 M. Diluem-se 35 ml de ácido acético glacial a 100 ml com água.

Carbonato de amônio, solução a 20% p/v em água. Quando não em uso, mantém-se em lugar fresco. Prepara-se cada 2 dias.

Hematoxilina, 0,05%. Dissolvem-se, em 80 ml de água à ebulição 0,050 g de hematoxilina². Deixa-se esfriar e dilui-se a 100 ml em balão aferido. Conserva-se em condições de uso por alguns dias.

Solução de amido, 2%. Obtém-se uma pasta com 2 g de amido solúvel e água. Junta-se esta em água à ebulição, deixa-se ferver por alguns minutos e dilui-se a 100 ml. Prepara-se no momento de usar.

Solução de acetato, *buffer* pH 6,0. Dissolvem-se 77,0 g de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ e 54,5 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em água. Juntam-se 6 ml de ácido acético glacial e diluem-se a 500 ml em balão volumétrico. Determina-se o pH com o auxílio de potenciômetro, ajustando-o.

Soluções-padrão de alumínio. Dissolvem-se em água morna 0,8401 g de cristais de alumen de amônio, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$,

² Hartman-Leddon Co. Philadelphia, Pa.

conservado alguns dias em dessecador. Deixa-se esfriar, adicionam-se 2 ml de ácido acético 6 M para prevenir hidrólise e diluem-se a 1 litro em balão aferido. Cada mililitro desta solução encerra 50 microgramas de *Al*. Mediante diluições posteriores preparam-se, em balões volumétricos de 100 ml, soluções de trabalho com 1, 2, 3 e 5 microgramas de *Al* por mililitro, contendo 2 ml de ácido acético 6 M por litro.

Soluções-padrão de ferro. Dissolvem-se 0,3511 g de $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em cerca de 50 ml de água e 5 ml de H_2SO_4 concentrado. Adicionam-se 2 ml de HNO_3 para oxidar o sal ferroso a sulfato férrico. Aquece-se brandamente para eliminar óxidos de nitrogênio, deixa-se esfriar e completa-se o volume a 500 ml. Um mililitro desta solução contém 100 microgramas de *Fe*. Preparam-se soluções contendo 1, 2, 3 e 5 microgramas de *Fe* por mililitro, a partir de alíquotas da solução estoque, diluídas a 100 ml com solução de ácido sulfúrico 0,05N.

Aparelhamento — O preparo da amostra foi conduzido segundo aparelhamento e processo já relatados (5). Para obtenção do extrato de cinzas em plantas e no desenvolvimento do processo analítico foi usado equipamento adicional conforme relação a seguir:

Mufla.

Cadinhos de porcelana, 30 ml.

Coluna de vidro pirex carregada com resinas de troca-iônica, para purificação de água destilada.

Balões volumétricos de 25 ml aferidos, dotados de rolhas esmerilhadas.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 ml e graduada de 1 ml.

Espectrofotômetro Beckman, modelo B.

Processo — Pesam-se 0,100 ou 0,200 g do tecido sêco de plantas moído em moinho Wiley, transferem-se para cadinho de porcelana e incinera-se a amostra na mufla a 550°C, para obtenção de resíduo branco ou quase isento de carvão. Dissolve-se a cinza juntando, por meio de pipeta, 5 ml de HCl 0,1 N e diluem-se com água a um volume definido, 10 a 20 ml usualmente, de modo que a solução não contenha mais que cerca de 5 microgramas de alumínio e ferro por mililitro. Pipeta-se 1 mililitro da solução depois de homogenizada com a própria

pipeta, e transfere-se esta alíquota para balão de 25 ml. Juntam-se, na ordem, 5 ml da solução *buffer* de acetato, 1 ml da solução de amido, 1 ml da solução de hematoxilina e 5 ml da solução de carbonato de amônio (1 g do sal), homogenizando o conteúdo do balão após adição de cada reagente. Espera-se 15 minutos e acrescentam-se 2 ml de ácido acético 6 M, agitando lentamente, a fim de evitar efervescência tumultuosa. Continua-se agitando até eliminar o excesso de dióxido de carbono. Ajusta-se o volume a 25 ml com água e homogeniza-se. Conjuntamente, faz-se uma prova em branco contendo água desmineralizada e os reativos, de acôrdo com a marcha descrita.

Lê-se a absorvência alternadamente a 610 e 690 milimicrons, usando a prova em branco como referência.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características dos espectos de absorvência — As densidades óticas das soluções contendo alumínio e ferro foram lidas em vários comprimentos de onda, entre 500 e 800 milimicrons. A absorvência máxima para o complexo hematoxilina-alumínio isolado obteve-se a 610 milimicrons e para o complexo hematoxilina-ferro, entre 660 e 690 milimicrons. Os gráficos da figura 1 mostram as características de absorvência das duas côres obtidas com 5 microgramas de *Al* e 5 microgramas de *Fe* em 25 ml de volume, com os reagentes e solução *buffer* de acetato. No processo aqui estudado foram escolhidos os comprimentos de onda de 610 e 690 milimicrons, tendo como resultado a diferença nos espectros de absorvência dos dois constituintes, e as regiões em que as leituras podem ser feitas com maior exatidão. A 610 milimicrons uma solução de ferro é aproximadamente 2,5 vezes menos sensível do que uma solução de alumínio de igual concentração.

Curvas de calibração — As curvas de calibração foram preparadas com soluções contendo *Al* e *Fe* separadamente nas concentrações de 0, 0,04, 0,08, 0,12 e 0,20 ppm, de acôrdo com a marcha analítica descrita.

Na figura 2 são apresentadas as relações entre a concentração de cada componente e as densidades óticas, obtidas para cada comprimento de onda. As absorvências e concentrações seguem a lei de Beer nos casos considerados.

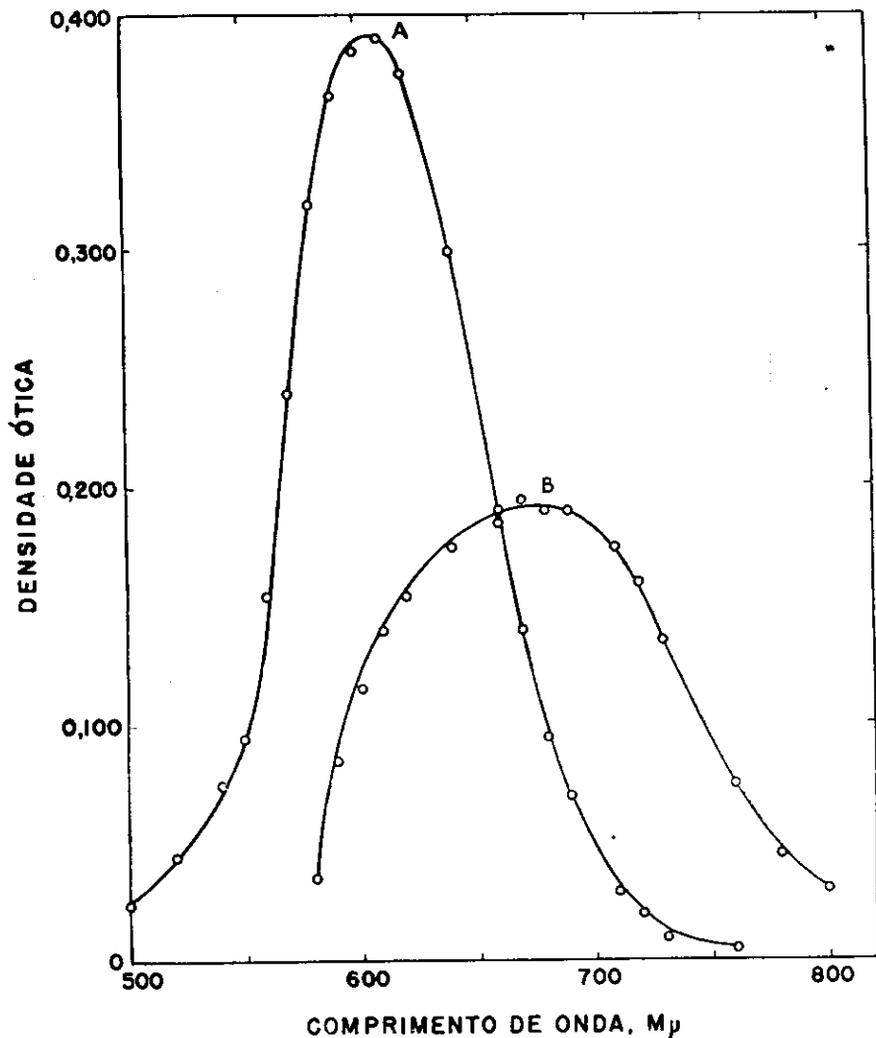


FIGURA 1. — Características das curvas de absorvência para os complexos alumínio-hematoxilina (A), e ferro-hematoxilina (B), entre 500 e 800 milimicrons. Soluções contendo, respectivamente, 5 microgramas de Al e 5 microgramas de Fe em 25 ml de volume e leituras efetuadas com o espectrofotômetro Beckman, modelo B.

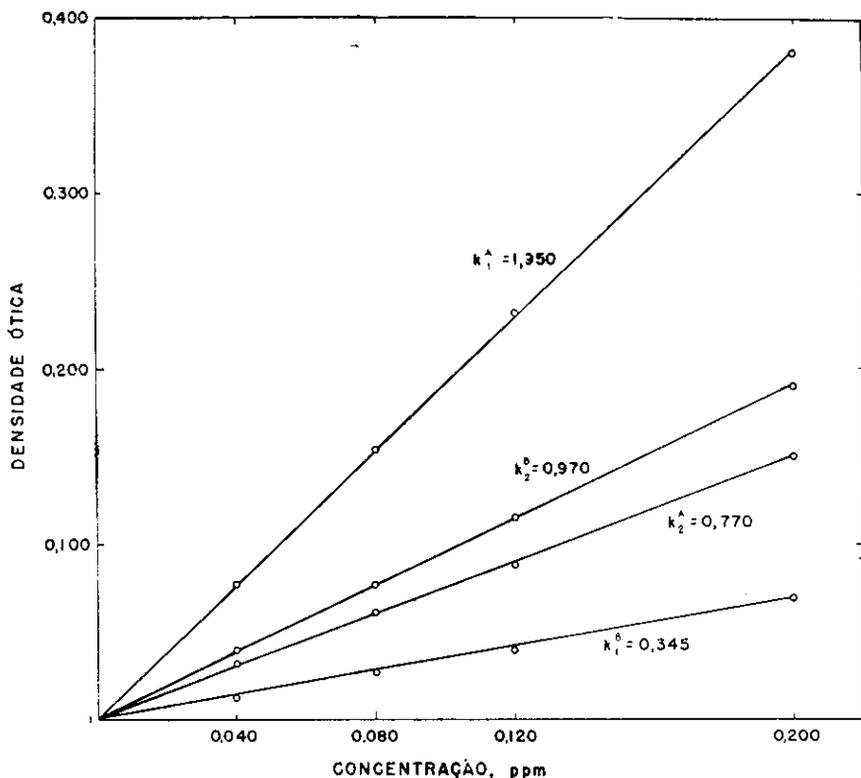


FIGURA 2. — Curvas-padrão de concentração-absorvência. Obtidas com soluções de *Al* e de *Fe*, 5 ml de *buffer*, 1 ml de solução de amido a 2%, 1 ml de solução de hematoxilina a 0,05%, 5 ml de carbonato de amônio a 20%, 2 ml de ácido acético 6 M, diluídos a 25 ml e densidades óticas lidas no espectrofotômetro Beckman, modelo B, a 610 milimicrons (A) e 690 milimicrons (B).

Em um sistema em que os dois componentes citados formam mistura desconhecida, a concentração de um deles pode ser calculada mediante a equação (4):

$$(1) \quad C_1 = \frac{\begin{matrix} B & A \\ k_2 & D \end{matrix} \begin{matrix} A & B \\ k_1 & D \end{matrix}}{\begin{matrix} B & A \\ k_2 & k_1 \end{matrix} \begin{matrix} A & B \\ k_2 & k_1 \end{matrix}}$$

onde C_1 é a concentração do alumínio; k_1^A e k_1^B , k_2^A e k_2^B , as constantes para o alumínio e ferro, respectivamente, nos comprimentos de onda A (610 μ) e B (690 μ); D^A e D^B representam as densidades

óticas da amostra com concentrações desconhecidas de Al e Fe , nos respectivos comprimentos de onda.

Na obtenção dos dados foi usada a equação

$$(2) \quad C_1 = 0,597 D^A - 0,474 D^B$$

obtida substituindo os valores numéricos das constantes (figura 2) na equação 1 e simplificando-a.

Efeitos do pH — A cor produzida e a intensidade variam em função do pH. Para garantir resultados reprodutíveis as amostras devem ser ajustadas a um pH constante. No presente caso de cinzas de plantas o controle do pH da solução da amostra com uma solução *buffer* de acetato mostrou-se adequado. Basset e Tomkins (1) recomendam o ajuste inicial do pH da amostra com carbonato de amônio até viragem do vermelho de metilo, por titulação de alíquota à parte, e depois a adição da solução *buffer* de acetato. A primeira medida mostrou-se dispensável nas condições estudadas. O uso de 5 ml de solução de carbonato de amônio a 20% (1 g do sal) permite formação rápida e perfeita da laca na faixa adequada de pH (pH 8,0 — 8,5).

Concentração do colóide — Um colóide protetor é necessário para estabilidade do complexo alumínio-hematoxilina. O amido apresenta a vantagem de intensificar ligeiramente a cor desenvolvida (1). Tentativas para uso de álcool polivinílico não foram bem sucedidas no presente estudo. A quantidade de amido indicada no processo (0,02 g) satisfaz, garantindo perfeita dispersão da laca. Quantidades mais baixas podem provocar redução aparente na concentração de alumínio.

Interferência de íons — Uma série de íons, que podem estar presentes no extrato de cinzas de plantas, foram testados quanto aos seus efeitos na absorvência. Os resultados obtidos são apresentados no quadro 1. Como se nota, não interferem na dosagem do alumínio quantidades moderadamente elevadas dos íons cálcio, magnésio, zinco, fosfato, níquel (II), borato e cloreto. Geralmente quantidades elevadas dos íons manganês (II), cobre (II), vanadato, cobalto (II), molibdato e cromo (III e VI) interferem. Nas plantas, entretanto, são muito baixos os níveis dos elementos interferentes, de maneira a não constituir obstáculo ao método. As quantidades que não interferem de Mn, Cu, V, Co, Mo e Cr, conforme atestam os dados, são ainda várias vezes mais elevadas em relação às que normalmente derivam das plantas.

QUADRO 1. — Estudos sobre interferência de íons na determinação espectrofotométrica do alumínio, pela hematoxilina

Íons	Quantidade adicionada	Al presente	Al encontrado	Diferença
	μg	μg	μg	μg
Ca^{+2} ...	1 000	4	4,02	+ 0,02
Mg^{+2} ...	200	3	2,90	— 0,10
	100	3	3,00	0,00
Mn^{+2} ...	50	4	2,40	— 1,60
	20	4	4,15	+ 0,15
	10	2	1,98	— 0,02
Zn^{+2} ...	50	4	4,10	+ 0,10
	5	4	3,98	— 0,02
Cu^{+2} ...	50	4	1,45	— 2,55
	10	4	2,78	— 1,22
	5	3	3,05	+ 0,05
	1	4	4,05	+ 0,05
Ni^{+2}	50	4	4,10	+ 0,10
	5	4	4,00	0,00
VO_3^- ...	50	3	4,55	+ 1,55
	5	4	4,10	+ 0,10
	1	4	4,03	+ 0,03
Co^{+2} ...	100	4	2,55	— 1,45
	50	3	3,18	+ 0,18
	5	4	4,03	+ 0,03
MoO_4^{-2}	50	3	3,40	+ 0,40
	5	3	3,00	0,00
PO_4^{-3} ..	250	4	4,07	+ 0,07
BO_3^{-3} ..	50	4	3,95	— 0,05
Cr^{+3} ...	50	3	7,25	+ 4,25
	10	3	4,15	+ 1,15
	2,5	4	4,28	+ 0,28
	1	3	3,02	+ 0,02
CrO_4^{-2} ..	50	3	5,65	+ 2,65
	1	3	3,07	+ 0,07
Cl^-	1 775 ¹	4	4,02	+ 0,02

1 Esta quantidade corresponde a 0,05 e. mg de HCl na alíquota do extrato de cinzas (1 ml).

QUADRO 2. — Resultados analíticos de algumas amostras sintéticas

Número da amostra	Adicionado		Densidade ótica ¹		Encontrado Al	Diferença ppm
	Al	Fe	D ^A	D ^B		
1	0,200	0,000	0,390	0,065	0,202	+0,002
2	0,160	0,040	0,350	0,100	0,162	+0,002
3	0,080	0,080	0,210	0,100	0,078	-0,002
4	0,080	0,120	0,220	0,115	0,077	-0,003
5	0,040	0,160	0,180	0,140	0,041	+0,001
6	0,080	0,200	0,270	0,195	0,069	-0,011
7	0,120	0,120	0,325	0,180	0,109	-0,011
8	0,000	0,200	0,150	0,190	0,000	0,000

¹ A = 610 m μ ; B = 690 m μ . Erro = \pm 0,002

QUADRO 3. — Teste sobre precisão da determinação de alumínio em tecidos de plantas, pelo método da hematóxilina. Recuperação do alumínio adicionado

Material	Adicionado μS	Análise e limites de confiança 95% μS^2	Diferença encontrado- adicionado μS	Desvio em função da quantidade de Al colocada μS	%
Fólha de cafeeiro	0 1,0	0,86 \pm 0,09 1,88 \pm 0,08	0,86 0,88	+ 0,02	+ 2,0
Fólha de citros	0 1,0	0,92 \pm 0,12 1,91 \pm 0,03	0,92 0,91	- 0,01	- 1,0
Fólha de algodoeiro	0 2,0	0,55 \pm 0,09 2,49 \pm 0,12	0,55 0,49	- 0,06	- 3,0
Fólha de milho	0 1,0	2,37 \pm 0,10 3,41 \pm 0,10	2,37 2,41	+ 0,04	+ 4,0
Fruto de tomate	0 3,0	0,32 \pm 0,08 3,25 \pm 0,17	0,32 0,25	- 0,07	- 2,3
Flor e fruto de crotalária	0 0,5	3,71 \pm 0,07 4,21 \pm 0,10	3,71 3,71	0,00	0,0

1 Média de quatro amostras.

QUADRO 4. — Resultados analíticos de algumas amostras de plantas

Material	Concentração de <i>Al</i> no material sêco
	<i>ppm</i>
Algodão, lâmina	75
Algodão, lâmina	60
Arroz, fôlha	70
Café, fôlha	85
Café, fôlha	60
Café, semente	67
Café, palha	90
Café, palha	655 ¹
Cana-de-açúcar, bainha	270
Cana-de-açúcar, lâmina	395
Capim colônião, parte aérea	90
Crotolária, raiz	620
Crotolária, vagem e semente ²	635
Feijão, haste e fôlha	435
Figo, ramo	35
Labe-labe, raiz	630
Labe-labe, haste	105
Laranja, fôlha	88
Mamão, fôlha	115
Mamão, fruto	26
Milho, fôlha	349
Milho, fôlha	310
Tomate, fruto	30
Trigo, fôlha	280
Uva, bacêlo	96

1 Valor possivelmente afetado pela dificuldade em remover da amostra a contaminação com solo (terra-roxa)

2 Procedente de solo com acidez elevada.

Erros e precisão do método — Os dados do quadro 2 exemplificam a aplicação da equação 2 em oito misturas sintéticas de proporções variáveis de alumínio e ferro, analisadas segundo o processo descrito.

Pelo exame do referido quadro há evidência de que o erro é maior nas amostras em que a soma da concentração dos constituintes excede 0,2 ppm. Nas demais amostras, o erro calculado para uma determinação foi de $\pm 0,002$ ppm. Materiais com teor relativamente elevado de ferro e baixo de alumínio não podem ser dosados com a devida exatidão, uma vez que a quantidade total de material da amostra na alíquota deve ser conservada pequena para que a soma *Al* + *Fe* não exceda cêrca de 5 microgramas.

No quadro 3 são dados os resultados de testes com tecidos de plantas, variando entre 0,3 e 3,7 microgramas de *Al* na alíquota dosada.

A precisão do método, como mostram os limites de confiança, é comparável na análise do material e nas determinações efetuadas nas mesmas amostras acrescidas de uma quantidade conhecida de Al . A recuperação do alumínio adicionado ao extrato de cinzas permite testar a aplicação do método na análise de plantas.

Diluições — A seleção da diluição adequada para enquadramento da alíquota da amostra nas condições previstas no método pode constituir algum problema, considerando a concentração alta ou baixa do alumínio nos tecidos de diferentes plantas. Dentro dos limites de diluição apresentados no processo diversas amostras de tecidos de plantas têm sido dosadas satisfatoriamente. No quadro 4 são citados alguns exemplos do material analisado para se ter idéia da variação de concentração de alumínio encontrada. É possível conseguir uniformização da diluição necessária quando se trabalha com material específico, como na análise foliar de determinada cultura.

4 — CONCLUSÕES

O método descrito permite dosar pequenas quantidades de alumínio com a rapidez e exatidão exigidas nos laboratórios de análises de plantas e sua principal vantagem provavelmente reside em facilitar a operação em série nos processos analíticos. Partindo do material seco e moído podem ser analisadas de 30 a 40 amostras por dia.

A aplicação do método na análise de tecidos de plantas foi comprovada de modo eficiente através da precisão e recuperação obtidas. O alumínio adicionado ao extrato de cinzas foi recuperado com um erro sempre inferior a $\pm 5\%$.

A interferência do ferro pode ser contornada pelo sistema de separação espectral em dois diferentes comprimentos de onda, calculando-se a concentração do alumínio através da equação:

$$C_1 = \frac{k_2^B D^A - k_2^A D^B}{k_2^B k_1^A - k_2^A k_1^B}$$

onde C_1 representa a concentração do alumínio; k_1^A e k_1^B , k_2^A e k_2^B , as constantes para o alumínio e ferro respectivamente nos comprimentos de onda A (610 $m\mu$) e B (690 $m\mu$); D^A e D^B , as densidades óticas da

amostra contendo *Al* e *Fe* em concentrações desconhecidas, nos comprimentos de onda correspondentes.

Outros elementos como manganês, cobre, vanádio, cobalto, molibdênio, e cromo não constituem obstáculo ao método nas concentrações que ocorrem nas plantas. Não interferem os elementos cálcio, magnésio, fósforo, zinco, níquel, boro e cloro.

SUMMARY

A procedure is described for the spectrophotometric determination of aluminum in ash extracts of plant tissue using the organic dye hematoxylin, without removal of iron. It has been devised by modifying and incorporating previously published procedures for water and uranium materials.

The proposed method provides a rapid determination of small amounts of aluminum up to 5 micrograms, with a recovery error smaller than ± 5 per cent, as tested for several plant materials.

Manganese, copper, molybdenum, vanadium, cobalt, and chromium in quantities usually encountered in plant tissue do not interfere with the method.

RAPID DETERMINATION OF ALUMINUM IN PLANT MATERIAL

LITERATURA CITADA

1. BASSET, L.G. & TOMKINS, F.S. Aluminum, gallium, indium, and thallium. In Clement J. Rodden, ed. Analytical Chemistry of the Manhattan Project. New York, MacGraw-Hill Book Company, Inc., 1950. p. 385-387.
2. GILBERT, F.A. Mineral nutrition of plants and animals. Norman, Oklahoma, University of Oklahoma Press, 1948. 131 p.
3. HATFIELD, W.D. Soluble aluminium and the hematoxylin test in filtered waters. Ind. Eng. Chem. 16:233-234. 1924.
4. KNUDSON, W.H., MELOCHE, V.W. & JUDAY, C. Colorimetric analysis of a two component color system. Ind. Eng. Chem., Analytical Edition, 12:715-718. 1940.
5. LOTT, W.L., NERY, J.P., GALLO, J.R. & MEDCALF, J.C. A técnica de análise foliar aplicada ao cafeeiro. Campinas, Instituto agrônômico, 1956. 29 p. (Boletim n.º 79)
6. MELLAN, I. Organic reagents in inorganic analysis. The Blakiston Company, Philadelphia, 1941. p. 113-115, 236-237.
7. SANDELL, E.B. Colorimetric determination of traces of metals. Interscience Publishers, Inc. New York, N.Y. 1944. p. 121-123.
8. SNELL, F.D. & SNELL, C.T. Colorimetric methods of analysis. Second Edition. D. Van Nostrand Company, Inc. New York, 1936. p. 266-267.