

APLICAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA 2,2'-DIPYRIDIL CETOXIMA NA DETERMINAÇÃO DO COBALTO EM PLANTAS.*

A. O. JACINTHO**
N. A. DA GLÓRIA**

RESUMO

Os resultados obtidos nos estudos da parte experimental do método da 2,2'-dipiridil cetoxima, permitiriam o estabelecimento de uma técnica para a determinação do cobalto em plantas.

A aplicação do método foi precedida de uma avaliação de sua amplitude, exatidão e precisão.

Verificou-se que nos intervalos de 0,9 a 9,0 ou de 1,0 a 10,0 microgramas de cobalto/3 ml do solvente, foram obtidos os menores erros relativos da concentração. Dentro dos limites estudados, o método segue a lei de Beer.

A precisão da técnica proposta, avaliada através de ensaios de recuperação, foi considerada satisfatória.

INTRODUÇÃO

Embora não tenha sido definitivamente demonstrada a necessidade do cobalto às plantas superiores, várias respostas têm sido obtidas na produção de diversas culturas, pela aplicação do citado elemento (TISDALE & NELSON, 1966).

Em 56 amostras de plantas analisadas, FUJIMOTO & SHERMAN (1950), obtiveram de 0,2 a 7,5 ppm de cobalto, com um valor médio de 1,62ppm. Para BOWEN (1966), o teor de cobalto em tecido da plantas variou de 0,2 a 5,0ppm. VANSELOW (1966) compilou dados de diversos pesquisadores, onde são encontrados valores de 0,01 a 7,5ppm de cobalto nos mais variados vegetais. Na América do Norte, na região de Nevada LAMBERT & BLINCOE (1971) chegaram a resultados de 0,8 a 23ppm de cobalto, em trigo forrageiro. Em áreas consideradas deficientes,

* Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Entregue para publicação em 11/02/1976.

** Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" — Piracicaba — S.P.

tanto as leguminosas como as gramíneas apresentaram menos que 0,07ppm de cobalto (KUBOTA & ALLAWAY, 1972).

Com o objetivo de se estabelecer uma técnica relativamente simples e rápida, com adequada sensibilidade para a determinação de cobalto em plantas, foram estudados os diversos aspectos do método espectrofotométrico da 2,2-dipiridil cetoxima, proposto por HOLLAND & BOZIC (1968).

Assim, já foram estudados; o reativo, o pH e o sistema tampão (JACINTHO, 1975a); os solventes e a extração do composto colorido (JACINTHO, 1975b); o efeito de diversos íons e a remoção das interferências (JACINTHO, 1976a).

No presente trabalho, procurou-se inicialmente avaliar a amplitude, a exatidão e a precisão do método, para posteriormente ser proposta uma técnica para a determinação do cobalto em plantas, tendo como base, os resultados dos estudos já mencionados.

MATERIAL E MÉTODO

Estudo da amplitude, exatidão e precisão do método

De forma bastante sumária, HOLLAND & BOZIC (1968), descreveram um estudo onde analisaram a precisão e exatidão do método da 2,2'-dipiridil cetoxima. Os autores, empregando 3 níveis de cobalto, determinaram o citado elemento com dez repetições, obtendo um coeficiente de variação que oscilou de 0,19 a 1,2%. Indicando uma completa recuperação das quantidades em estudo, consideraram a técnica satisfatoriamente precisa e exata. Segundo os referidos autores, o método segue a lei de Beer.

1 — Amplitude e exatidão.

As informações obtidas através dos estudos de HOLLAND & BOZIC (1968), sobre a precisão e exatidão do método em questão, não foram consideradas suficientes.

Procurando-se obter dados mais completos sobre o assunto, foi empregada a técnica de RINGBOM (1939), apresentada por AYRES (1949) e já utilizada por diversos autores em estudos dessa natureza (BITTENCOURT, 1965; JACINTHO, 1967; BERGAMIN, 1967; GLÓRIA, 1968; GRANER, 1972).

De acordo com a referida técnica, calcula-se o erro relativo (E) para os diversos intervalos de concentração, em função de um erro fotométrico absoluto de 1%, pela equação de Ringbom:

$$E = \frac{230}{\Delta T}, \text{ na qual } \Delta T \text{ corresponde a variação na transmitância}$$

quando as concentrações variam de 10 vezes. Assim, será possível avaliar a amplitude ideal de concentração para o método ou aquela sujeita ao menor erro.

Segundo AYRES (1949), para os sistemas que seguem a lei de Beer, o ponto de inflexão da curva obtida colocando-se a absortância ($1 - T \%$) como ordenada e o logarítmo da concentração como abcissa, deve ocorrer no ponto correspondente a 63,2% de absortância. Segundo o método de Ringbom, neste ponto o erro relativo é mínimo.

Reativos

Soluções padrão de cobalto — A partir da solução estoque (JACINTHO, 1975a), foram preparadas soluções de uso contendo: 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 — 0,5 — 0,6 — 0,7 — 0,8 — 0,9 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 — 5,0 — 6,0 — 7,0 — 8,0 — 9,0 — 10,0 — 20,0 — 30,0 — 40,0 — 50,0ppm de cobalto.

Solução de 2,2'-dipiridil cetoxima (2,2'-DC) a 1,0% — Preparada em solução hidroalcoólica a 80% a partir da obtida conforme a técnica descrita por JACINTHO (1975a).

Solução tampão — Foram misturados, 100 ml de solução 1M em citrato de sódio (trissódico), com 50 ml de solução de trietanolamina (1 + 2). Adicionou-se em seguida, a solução de ácido cítrico a 30%, até pH 7,8.

Soluções 0,1 e 2N em HC1 — Preparadas a partir de 6N (destilado).

Procedimento

Foram transferidos para funil de separação de 60ml, 1ml das soluções de uso, 10ml de solução 0,10N em HC1, 10ml da solução tampão e 1,0ml da solução do reativo. Adicionaram-se, a seguir, 5,0ml de clorofórmio e agitou-se, energicamente, por 30 segundos. Após a separação das fases, o solvente foi cuidadosamente drenado para outros funis de separação (secos) de 60ml e foram adicionados exatamente 3,0ml de solução 2N em HC1. Os funis foram novamente agitados por 30 segundos e, após a nova separação das fases, o clorofórmio foi descartado e a solução 2N em HC1, contendo o composto colorido, foi drenada para a célula do espectrofotômetro. As leituras foram efetuadas a 385nm contra prova em branco. Os resultados são apresentados no quadro 1 e, com auxílio dos mesmos, construiu-se o gráfico representado na figura 1.

2 — Precisão.

A precisão do método foi avaliada através da análise dos valores de absorvância de soluções contendo o composto colorido obtidos com repetição e a partir de padrões contendo diferentes concentrações de cobalto. Foram empregadas soluções padrão contendo 0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 e 5,0ppm de cobalto e o procedimento seguido foi o mesmo descrito em 1. As determinações foram efetuadas com 5 repetições para cada padrão e os resultados constam no quadro 2.

Aplicação do método na determinação do cobalto em plantas.

A sensibilidade conseguida para o método da 2,2'-DC, permitindo a determinação de até 0,5 micrograma de cobalto, pode ser considerada satisfatória. Contudo, de acordo com as razões já expostas (JACINTHO, 1975b), sobre a necessidade do emprego de amostras relativamente grandes e em função da limitação do método em relação ao pH, considerou-se mais adequada a utilização do processo por via seca, para a decomposição do material vegetal.

GORSUCH (1959) não encontrou diferenças nas quantidades determinadas de cobalto, quando comparou os processos de mineralização da matéria orgânica, por via úmida e por via seca.

Estudando a influência da temperatura durante a calcinação sobre os resultados da dosagem de cobalto em vegetais pelo método do sal nitroso R, após a extração do quelato formado com 1 nitroso-2 naftol, MORÉ (1969) não obteve variações significativas quando as amostras foram queimadas a 550, 650 ou 750°C. O referido autor efetuou a incineração das amostras a 700°C.

O procedimento empregado para a decomposição das amostras foi estabelecido após uma série de experimentos prévios realizados com base nas técnicas propostas por JACKSON (1958); JOHSON & ULRICH (1959); CATANI, GLÓRIA & BERGAMIN FILHO (1962); BITTENCOURT (1965); GALLO (1968); ALCARDE (1969); GRANER (1972).

O material vegetal utilizado foi previamente seco a 60 — 70°C até peso constante, sendo, a seguir, finamente moído.

A reprodutividade do método, no que se refere a sua aplicação foi apreciada através de determinações com 5 repetições realizadas com quatro vegetais diferentes.

Uma avaliação da exatidão da técnica proposta foi obtida de ensaios de recuperação. Contudo, com base nas considerações e restrições apresentadas por MITCHELL (1955), no que se refere a esse tipo

de ensaio, procurou-se adicionar as quantidades de cobalto nas amostras, somente após as mesmas terem sido incineradas.

Reativos

Os reativos empregados já tiveram seu preparo descrito anteriormente

Procedimento

Amostras de 1,000 a 5,000g de cada vegetal foram transferidas para cápsulas de porcelana e incineradas a 550-600°C durante duas horas.

As cápsulas foram retiradas do forno e, após as cinzas terem atingido a temperatura ambiente, foram ligeiramente umedecidas, adicionando-se, a seguir, 10ml de solução de HCl (1 + 1).

Nas amostras utilizadas para o ensaio de recuperação, adicionou-se 1ml dos padrões de cobalto contendo 2 e 3ppm do elemento, antes da adição do HCl.

O material foi aquecido a 70-80°C em banho-maria até completa secagem.

Adicionaram-se, a seguir, 10ml de solução 0,1 N em HCl e procedeu-se a um ligeiro aquecimento em banho-maria, para promover a solubilização.

O material foi filtrado através de papel de filtro S&S 589 faixa preta, diretamente para os funis de separação de 60ml.

As cápsulas e os filtros foram lavados com duas porções de 5ml da solução tampão e uma porção de água desmineralizada e quente.

Adicionaram-se, a seguir, nos funis de separação, 1,0ml da solução do reativo, 5,0ml de clorofórmio e agitou-se energicamente por 30 segundos.

Após a separação das fases, o solvente foi cuidadosamente drenado para outros funis de separação (secos) de 60ml, aos quais foram adicionados exatamente 3,0ml de solução 2 N em HCl. Os funis foram novamente agitados por 30 segundos e, após a nova separação das fases, o clorofórmio foi descartado e a solução 2 N em HCl, contendo o composto colorido, foi drenada para a célula do espectrofotômetro. As leituras foram efetuadas a 385 nm contra prova em branco e os resultados apresentados no quadro 3.

Segundo o procedimento proposto, foram obtidos alguns dados referentes ao teor de cobalto em diversos vegetais. Os resultados estão relacionados no quadro 4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da amplitude, exatidão e precisão do método.

1 — Amplitude e exatidão.

QUADRO 1 — Valores dos erros relativos da concentração em função do erro fotométrico absoluto de 1%, para os diversos intervalos de concentração de cobalto. Leituras a 385 nm.

Amplitude de concentração cobalto/solvente microgramas/3ml	$E = \frac{230}{T\Delta}$
0,1 — 1,0	12,10
0,2 — 2,0	6,86
0,3 — 3,0	5,22
0,4 — 4,0	4,42
0,5 — 5,0	3,81
0,6 — 6,0	3,68
0,7 — 7,0	3,56
0,8 — 8,0	3,45
0,9 — 9,0	3,43
1,0 — 10,0	3,43
2,0 — 20,0	3,93
3,0 — 30,0	4,89
4,0 — 40,0	6,05
5,0 — 50,0	7,54

Através dos dados obtidos (quadro 1), verifica-se que, nos intervalos compreendidos entre 0,9 e 9,0 ou 1,0 e 10,0 microgramas de cobalto/3ml do solvente, foram obtidos os menores erros relativos de concentração. Ou seja, dentro dessa amplitude de concentração, as medidas fotométricas serão efetuadas com um mínimo erro relativo de concentração quando se emprega a técnica descrita para a determinação do cobalto com a 2,2'-dipiridil cetoxima.

Calculando-se a concentração correspondente ao ponto de inflexão da curva traçada segundo a técnica de RINGBOM (1939), obteve-se o valor de 4,35 microgramas de cobalto por 3 ml de solvente.

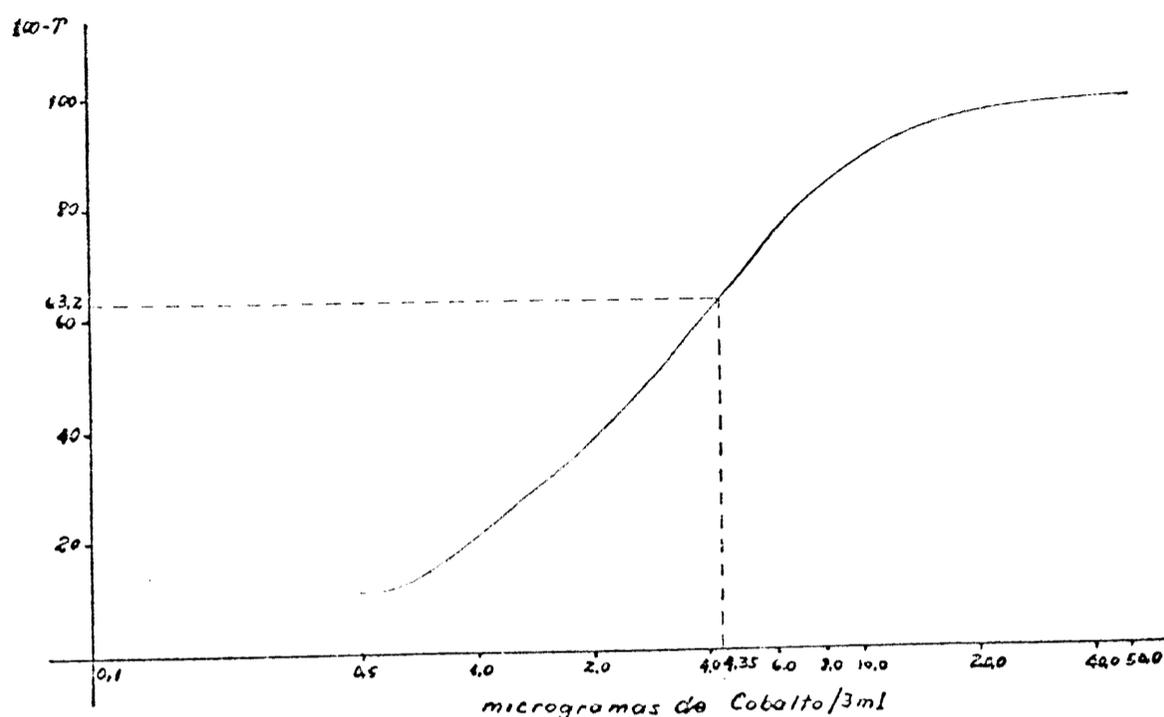


Figura 1 — Curva do complexo Co-2,2'-DC, obtida segundo RINGBOM (1939). Leituras a 385nm.

Considerando-se o valor da absorbância para o ponto da curva de Ringbom, cuja concentração encontra-se mais próxima daquela correspondente ao ponto de inflexão (4,0 microgramas de cobalto), obteve-se uma estimativa da absorbância molar do composto da ordem de 17.685.

2 — Precisão

Os dados do quadro 2 permitem concluir que o método apresenta satisfatória reprodutividade de leituras quando aplicado a soluções puras, podendo ser considerado preciso.

Através dos dados do quadro 2, foi calculada a equação de regressão:

$$X = (A - 0,004) 10,101,$$

onde A representa a absorbância da solução X , microgramas de cobalto/3ml do solvente.

Com base nos referidos dados, calculou-se o coeficiente de correlação linear. O valor de $r = 1,006$ obtido, indica que para o intervalo de concentração considerado (0,5 a 5,0 microgramas de cobalto), o método segue a lei de Beer.

QUADRO 2 — Estudo sobre a precisão do método da 2,2'-dipiridil cetoxima de determinação do cobalto através da análise dos valores de absorvância obtidos com 5 repetições e a partir de soluções padrão.

microgramas de cobalto	absorvância média de 5 repetições	desvio padrão da média	C.V. %
0,00	0,000	—	
0,50	0,054	$\pm 0,002$	10,14
1,00	0,102	$\pm 0,004$	4,38
2,00	0,204	$\pm 0,005$	2,68
3,00	0,306	$\pm 0,002$	1,79
4,00	0,398	$\pm 0,002$	1,12
5,00	0,496	$\pm 0,002$	1,10

QUADRO 3 — Resultados da determinação do cobalto em vegetais (5 repetições), pelo método da 2,2'-DC. Avaliação da exatidão da técnica, através de ensaios de recuperação.

Vegetal	microgramas de cobalto		% de recuperação	ppm de cobalto	C.V. %
	adicionados	determinados			
Soja (folhas) 2,00g	0,0	0,72		$0,36 \pm 0,009$	5,55
	2,0	2,70	99,0		
	3,0	3,80	102,0		
Capim kiquiuio 2,00g	0,0	0,76		$0,38 \pm 0,012$	7,58
	2,0	2,90	107,0		
	3,0	3,80	101,0		
Batata (folhas) 1,00g	0,0	1,84		$1,84 \pm 0,025$	2,97
	2,0	3,90	103,0		
	3,0	4,90	102,0		
Cana (folhas) 5,00g	0,0	0,46		$0,09 \pm 0,005$	11,96
	2,0	2,50	102,0		
	3,0	3,40	98,0		

Os dados do quadro 3 permitem concluir que:

a) o método da 2,2'-DC apresentou uma precisão considerada adequada, quando empregado conforme a técnica proposta para a determinação do cobalto em vegetais;

b) a recuperação variando de 98 a 107% reflete uma exatidão satisfatória para o método, quando aplicado em análises de plantas.

QUADRO 4 — Resultados da determinação do cobalto em vegetais

Vegetal	Concentração de cobalto ppm
Capim colonião	0,10
Capim gordura	0,17
FORAGEIRA (glycine)	0,17
FORAGEIRA (stylosantes)	0,53
Siratiro (feno)	0,43
Guandu (ramos e folhas)	0,70
Feijão (planta toda)	0,40
Milho (folha)	0,27
Arroz (grão)	0,13
Café (fruto)	0,10
Café (folha)	0,20
Tomate (folha)	0,40
Ervilha (folha)	0,50
Beringela (folha)	0,10
Pimentão (folha)	0,82
Cenoura (folha)	0,24
Cebola (cabeça)	0,47
Amendoim (folha)	0,27
Goiaba (folha)	0,13
Chicória	0,20
Beterraba	0,13
Pinus elliotti	0,23

CONCLUSÕES

Os dados obtidos através dos estudos referentes à parte experimental do método espectrofotométrico da 2,2-dipiridil cetoxima, permitiram estabelecer uma técnica para a determinação do cobalto em plantas.

O método, nas condições em que é proposto, apresenta precisão e exatidão consideradas satisfatórias e o menor erro relativo da concentração é obtido quando se determina de 0,9 a 9,0 ou de 1,0 a 10,0 microgramas de cobalto. O método segue a lei de Beer e a absorvidade molar do composto em clorofórmio ou em HCl 2N é de 17.685.

Foram estudadas determinações de cobalto em diversos vegetais e o procedimento sugerido é o seguinte:

Curva padrão

1 — Transferir para funis de separação de 60 ml, das soluções padrão de uso (0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 e 5,0 ppm de cobalto) e adicionar 10ml de solução 0,10 N em HCl.

2 — Juntar 10ml da solução tampão, 1,0 ml da solução do reativo (2.2'-DC a 1% em etanol a 80%), 5,0 ml de clorofórmio e agitar energicamente por 30 segundos.

3 — Esperar a separação das fases e drenar cuidadosamente o solvente orgânico para outros funis de separação de 60ml (secos).

4 — Adicionar exatamente 3,0ml de solução 2 N em HCl e agitar novamente por 30 segundos.

5 — Descartar o clorofórmio, drenado, a seguir, a solução de HCl contendo o composto colorido, para as células do espectrofotômetro.

6 — Efetuar as leituras contra a prova em branco a 385nm.

Procedimento

1 — Transferir para cápsula de porcelana, de 1,000 a 5,000g da amostra seca e moída e incinerar a 550-600°C durante duas horas.

2 — Retirar do forno, esperar esfriar e umedecer levemente.

3 — Adicionar 10ml de solução de HCl (1 + 1) e aquecer o material a 70-80°C em banho-maria, *até completa secagem*.

4 — Juntar 10ml de solução 0,10 N em HCl e aquecer levemente para promover a solubilização.

5 — Filtrar através de papel de filtro S&S 589 faixa preta, diretamente para os funis de separação de 60ml.

6 — Daqui em diante, prosseguir conforme já descrito a partir do item 2 da curva padrão (lavando as cápsulas e os filtros com o tampão e 5 ml de água desmineralizada quente).

SUMMARY

THE COBALT DETERMINATION IN PLANT MATERIAL BY THE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF THE 2,2'-DIPYRIDYL KETOXIME

As a conclusion of the studies on the spectrophotometric method using 2,2'-dipyridyl ketoxime, it is suggested a technique for the cobalt determination in plants.

The method, as it is proposed, presents both precision and accuracy considered satisfactory, and the least relative error of the concentration is obtained in the range from 0,9 to 9,0 or 1,0 to 10,0 microgrames of cobalt in 3ml of solvent.

It follows Beer's law and the molar absorptivity of the compound is 17.685.

The results of cobalt determination in several vegetables are presented.

LITERATURA CITADA

- ALCARDE, J.C., 1969 — A determinação do boro pelo método colorimétrico da curcumina. Tese de doutoramento apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" — USP, 78 pp. mimeografada).
- AYRES, G.H., 1949 — Evaluation of accuracy in photometric analysis. *Anal. Chem.*, **21**(5): 625-657.
- BERGAMIN FILHO, H., 1967 — A fotometria de chama de absorção e a determinação do magnésio. Tese de Livre-Docência apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP. 68 p.
- BITTENCOURT, V.C. de, 1965 — O método colorimétrico da 1-10 fenantrolina na determinação do ferro. Tese de doutoramento apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP., (mimeografada).
- BOWEN, H.J.M., 1966 — Trace Elements in Biochemistry. Academic Press, London — New York. 241 pp.
- CATANI, R.A., N.A. da GLÓRIA & H. BERGAMIN FILHO, 1962 — Determinação polarográfica do zinco em plantas, após a sua separação em resina trocadora de íons. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, vol. 19: 119-134.
- FUJIMOTO, G. & G.D. SHERMAN, 1950 — Cobalt content of typical soil and plants of the Hawaiian Islands. *Agon. Jour.* **42**: 577-81.
- GALLO, J.R., 1968 — A determinação do zinco pelo método espectrofotométrico do zincon. Tese de doutoramento apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP. 73 pp. (mimeografada).
- GLÓRIA, N.A. da, 1968 — A determinação colorimétrica do enxofre pelo método do cloronilato de bário. Tese de Livre-Docência apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP. 134 pp.
- GORSUCH, T.T., 1959 — Radiochemical investigations on the recovery for analysis of trace elements in organic and biological materials. *Analyst* **84**: 135-173.

- GRANER, C.A.F., 1972 — Determinação do cromo pelo método colorimétrico da difenil-carbazida. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 112 pp. (mimeografada).
- HOLLAND, W.J. & BOZIC, 1968 — Rapid spectrophotometric determination of cobalt with 2,2'-dipyridyl ketoxime. *Talanta*, **15**: 483-847.
- JACINTHO, A.O., 1967 — A determinação do cobre pelo método colorimétrico do dietil ditiocarbamato de sódio. Tese de doutoramento apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP. 82 pp. (mimeografada).
- JACINTHO, A.O., 1975a — A determinação espectrofotométrica do cobalto pelo método da 2,2'-dipiridil cetoxima (I). No prelo dos Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", n.º 19, vol. 32 (1975).
- JACINTHO, A.O., 1975b — A determinação espectrofotométrica do cobalto pelo método da 2,2'-dipiridil cetoxima (II). No prelo dos Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", n.º 23, vol. 32 (1975).
- JACINTHO, A.O., 1976a — A determinação espectrofotométrica do cobalto pelo método da 2,2'-dipiridil cetoxima (III). No prelo dos Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", n.º 3, vol. 33 (1976).
- JACKSON, M.L., 1958 — Soil Chemical Analysis. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall Inc., 498 pp.
- JOHSON, C.M. & A. ULRICH, 1959 — Analytical methods for use in plant analysis. *In*: Bulletin 766. California Agric. Exp. Sta. pp. 58-78.
- KUBOTA, J. & W.L. ALLAWAY, 1972 — Geografic distribution of trace elements problems. *In*: MORTVEDT, J.J., GIORDANO, P.M. & LINDSAY, W.L. (ed.). Micronutrientes in Agriculture. Soil Sci. of Am. Inc. Madison Wisconsin, USA, pp. 524-554.
- LAMBERT, T.L. & C. BLINCOE, 1971 — High concentration of cobalt in wheat grasses. *J. Sci. Fal. Agric.* **22**: 8-9.
- MITCHELL, R.L., 1964 — Trace elements in soil. *In*: BEAR, F.E. (ed.), Chemistry of the Soil. Reinhold Publishing Co. New York, pp. 320-368.
- MORÉ, E., 1969 — Sur le microdosage colorimétric du cobalt dans les végétaux: interférence du fer, contaminations par la terre. *An. Agron.*, **20**(5): 527-538.
- RINGBOM, A., — Uber die genauigkeit der colorimetrischen analysenmethoden, I.Z. Anal. Chem., **115**: 332-343 (microfilme).
- TISDALE, S.L. & W.L. NELSON, 1966 — Soil Fertility and Fertilizers. 2nd ed. The Macmillan Company. Collier Macmillan Ltd., London, Printed in USA, 694 pp.
- VANSELOW, A.D., 1966 — Cobalt. *In*: CHAPMAN, H.D., Diagnostic Criteria for Plants and Soils. University of California. Division of Agricultural Sciences, pp. 142-156.