

PORTARIA Nº 31, de 8 de junho de 1982.

O Secretário Nacional de Defesa Agropecuária, no uso de suas atribuições, tendo em vista o disposto no artigo 19 do Decreto nº 86.955, de 18 de fevereiro de 1982, e conforme delegação de competência que lhe foi conferida pela Portaria Ministerial nº 126, de 27 de maio de 1982:

RESOLVE:

Art. 1º - Aprovar os métodos analíticos, em anexo, que passam a constituir métodos padrões, oficiais, para análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes sujeitos a inspeção e fiscalização previstas na legislação acima referida.

Art. 2º - Esta portaria entra em vigor na data de sua publicação.

UBIRATAN MENDES SERRÃO

CAPITULO I
Fertilizantes Minerais

1. PREPARO DA AMOSTRA

Homogeneizar toda a amostra e dividir, por quarteação, em duas frações iguais. Uma das frações destina-se à análise granulométrica - quando a mesma for prevista - e a outra, às análises químicas.

A fração destinada às análises deve ser moída e passada totalmente em peneira com abertura de malha de 0,84 mm (pen. ABNT nº 20) para fertilizantes simples ou mistura úmida e de 0,42 mm (pen. ABNT nº 40) para fertilizantes secos, com tendência a segregar.

Executar estas operações com rapidez, evitando a perda ou absorção de umidade.

Homogeneizar e guardar em recipiente hermético.

Para as análises químicas de farinha de ossos, fosfatos naturais moídos, fosfatos de fusão e escórias de desfosforação, as amostras não devem sofrer a moagem acima indicada.

2. ANALISE GRANULOMÉTRICA

2.1 Para fertilizantes farelado grosso, farelado, granulado, mistura de grânulos, mistura granulada, termosfosfatos e escórias de desfosforação.

Equipamento:

- Peneiras com aro de 20 cm de diâmetro, 5 cm de altura e aberturas de malha de: 38 mm, 25 mm, 4,8 mm (ABNT 4 mm), (ABNT nº 5), 2,8 mm (ABNT nº 7), 2 mm (ABNT nº 10), 0,5 mm (ABNT nº 35), 0,3 mm (ABNT nº 50), 0,15 mm (ABNT nº 100) e 0,075 mm (ABNT nº 200).

- Agitador mecânico, de peneiras.

Procedimento:

a) Pesar integralmente a fração da amostra reservada para tal e colocar sobre as peneiras, encaixadas uma sobre a outra, ficando a de malha maior, acima, observando as aberturas de malha, de acordo com cada caso:

- para fertilizante farelado grosso: -----38 mm e 25 mm;
- para fertilizante farelado: ----- 4,8 mm e 2,8 mm;
- para fertilizante granulado, mistura de grânulos e mistura granulada: -----4 mm e 0,5 mm;
- para fertilizante em pó:----- 2 mm e 0,3 mm;
- para termosfosfatos e escórias de desfosforação: -----0,15 mm.

b) Agitar durante 5 minutos, no agitador mecânico.

c) Pesar as frações retidas em cada peneira.

d) Calcular o percentual, de acordo com as fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{\% da amostra passando na 1}^\circ \text{ ou única peneira} &= \\ &= 100 - \frac{R_1 \times 100}{G} \end{aligned}$$

% da amostra passando na 2º peneira, de malha menor =

$$= 100 - \frac{(R_1 + R_2) \times 100}{G}$$

em que:

G = peso (g) da amostra analisada.

R₁ = peso (g) da fração retida na 1º ou única peneira especificada.

R₂ = peso (g) da fração retida na 2º peneira especificada, de malha menor.

2.2 Para fosfatos naturais moldas.

Equipamento:

- Peneira com aro de 20 cm de diâmetro, 5 cm de altura e abertura de malha de 0,075 mm (ABNT nº 200).

Procedimento:

a) Pesar integralmente a fração da amostra reservada para tal, com precisão de 0,1 g.

b) Transferir para peneira com a abertura de malha de 0,075 mm.

c) Lavar com um fluxo moderado de água, com pressão máxima de 0,28 kg/cm² até que a água que passa através da peneira esteja límpida. Tomar cuidado para evitar perda da amostra por respingos.

d) Secar a 105°C, até peso constante, a fração retida na peneira, e pesar.

e) Calcular o percentual pela expressão:

$$\begin{aligned} \text{\% da amostra passando pela peneira n.}^\circ & \\ &= 100 - \frac{R \times 100}{G} \end{aligned}$$

R = peso (g) da fração retida na peneira.

G = peso (g) da amostra analisada.

2.3 Para fosfatos naturais mordos, contendo argila coloidal e para fosfatos naturais mordos e granulados.

Reagentes:

- Solução do agente dispersante - Dissolver 36 g de hexametáfosfato de sódio e 8 g de carbonato de sódio, em água e completar o volume a 1 litro.

Equipamento:

- Peneira com aro de 20 cm de diâmetro, 5 cm de altura e abertura de malha de 0,075 mm (ABNT nº 200).

- Agitador magnético ou de haste.

-

Procedimento:

a) Pesar integralmente a fração da amostra reservada para tal, com precisão de 0,1 g.

b) Transferir para um copo contendo 50 ml de solução do agente dispersante e 450 ml de água destilada.

c) Agitar, durante 5 minutos, evitando que o material fique retido na haste do agitador e nas paredes do copo.

d) Transferir a solução para a peneira especificada.

e) Lavar com um fluxo moderado de água, com pressão máxima de 0,28 kg/cm² até que a água que passa através da peneira esteja límpida. Tomar cuidado para evitar perda da amostra por respingos.

f) Secar a fração retida na peneira, a 105°C e pesar.

g) Calcular o percentual da amostra que passa pela peneira, pela expressão:

$$\begin{aligned} \% \text{ da amostra passando pela peneira} &= \\ &= 100 - \frac{R \times 100}{G} \end{aligned}$$

R = peso (g) da fração retida na peneira.

G = peso (g) da amostra analisada.

3. ANÁLISES QUÍMICAS

3.1 Nitrogênio total (N)

A) Método do ácido salicílico

Reagentes:

a) Ácido sulfúrico 93% - 98%, p.a.

b) Óxido de mercúrio ou mercúrio metálico, p.a.

c) Sulfato de potássio ou sulfato de sódio anidro, p.a.

d) Ácido salicílico, p.a.

e) Solução de sulfeto de potássio ou tiosulfato de sódio - Dissolver em água 40g de K₂S e completar a 1 litro (soluções de 40 g de Na₂S ou 80 gramas de Na₂S₂O₃ · 5H₂O por litro podem ser usadas).

f) Solução de hidróxido de sódio a 450 g/l - Dissolver aproximadamente 450 g de NaOH sólido em água, esfriar e diluir a 1 litro.

Conservar em recipiente de plástico.

g) Zinco em pó, (pó fino, impalpável).

h) Zinco granulado, p.a.

i) Indicador vermelho de metila - Dissolver 1 g de vermelho de metila em 200 ml de álcool etílico neutro.

j) Soluções padronizadas de ácido clorídrico ou sulfúrico 0,5 N ou 0,1 N quando a quantidade de nitrogênio for pequena.

k) Solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 N.

Equipamento:

Conjunto Digestor-destilador tipo Kjeldahl.

Procedimento:

- a) Transferir uma quantidade da amostra (0,7 g a 2,2 g) para um balão de Kjeldahl de 800 ml, juntar 40 ml de ácido sulfúrico em que foram dissolvidos 2 g de ácido salicílico, agitar para misturar perfeitamente e deixar, ao menos, 30 min. em repouso, agitando de vez em quando.
 - b) Acrescentar 5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ou 2 g de zinco em pó fino, agitar, esperar 5 minutos e aquecer em fogo brando até cessar a espuma.
 - c) Interromper o aquecimento, juntar 0,7 de HgO (ou 0,65 g de Hg metálico) e 15 g de K_2SO_4 ou 15 g de Na_2SO_4 anidro, em pó, e levar à ebulição até a solução tornar-se clara, continuando por mais 30 min., no mínimo (2 h para amostras contendo material orgânico.).
 - d) Esfriar, juntar 200 ml de água, adicionar 25 ml de solução de tiosulfato ou sulfeto e misturar.
 - e) Juntar 3-4 grânulos de zinco, inclinar o frasco de Kjeldahl, adicionar 3,5 ml de solução de NaOH a 45% para cada ml de solução de H_2SO_4 usada, sem agitar o frasco.
 - f) Ligar imediatamente o frasco Kjeldahl ao conjunto de destilação, cuja ponta do condensador deve se encontrar mergulhada em um erlenmeyer de 500 ml que contenha uma quantidade conhecida de ácido padronizado, de acordo com a quantidade provável de nitrogênio, e 5-7 gotas de vermelho de metila.
- Obs.: (essa quantidade de ácido deve conter um número de equivalentes miligramas tal que exceda de 1 o número de equivalente de N, provável na amostra).
- g) Misturar o conteúdo, imprimindo rotações ao frasco Kjeldahl e aquecer para destilar, recebendo, no mínimo, 150 ml de destilado na solução de ácido padronizado.
 - h) Retirar o frasco de erlenmeyer, lavar a ponta do condensador e titular o excesso de ácido com solução de NaOH padronizada.
 - i) Fazer uma prova em branco em idênticas condições, usando 5 ml ou 25 ml da solução padronizada de H_2SO_4 - 0,5 ou 0,1 N, respectivamente.
 - j) Calcular a porcentagem de nitrogênio, pela expressão:

$$\%N = \frac{[(V_1 \cdot N_1 - V_2 \cdot N_2) - (V_3 \cdot N_1 - V_4 \cdot N_2)] \cdot 1,4007}{G}$$

onde:

- V_1 = Volume de ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o NH_3 (amostra).
 N_1 = Normalidade do ácido.
 V_2 = Volume de NaOH, expresso em mililitros, gasto na titulação (amostra).
 N_2 = Normalidade de NaOH.
 V_3 = Volume de ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o NH_3 (prova em branco).
 V_4 = Volume de NaOH, expresso em mililitros, gasto na titulação (prova em branco).
G = Massa da amostra, expressa em gramas.

Obs.: 1) A absorção de amônia poderá ser feita em 50 ml de ácido bórico a 4%, neste caso a titulação será executada com solução padronizada de ácido 0,1 N. A quantidade de N destilado não deverá ultrapassar 65 mg.

2) Em amostras contendo nitrogênio amídico (Uréia) como única forma de nitrogênio orgânico, pode-se substituir 0,7 g de H_2O por 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e dispensar o prolongamento da digestão além dos 30 min.

B) Método da Liga de Raney

Reagentes:

- a) Pó catalítico de Raney (50% de Ni e 50% de Al). Cuidado. O pó catalítico de Raney reage vagarosamente com água ou umidade do ar formando alumina; evitar prolongado contato com ar e umidade durante estocagem ou uso.
- b) Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (93-98%), p.a.
- c) Óxido de mercúrio (HgO), p.a.
- d) Sulfato de potássio (K_2SO_4), p.a.

e) Solução de ácido sulfúrico -- sulfato de potássio.

Acrescentar, vagarosamente e com cuidado, 200 ml de H_2SO_4 a 625 ml de água destilada e misturar. Sem esfriar, juntar 106,7 g de K_2SO_4 e continuar a agitação até dissolver todo o sal. Diluir a quase 1 L e agitar. Esfriar, diluir para 1 L com água destilada e agitar. Evitar a absorção de NH_3 do ar durante a preparação, principalmente se ar comprimido for usado para misturar.

f) Solução de sulfeto ou tiosulfato. Dissolver em água 40 g de K_2S e completar a 1 L. Soluções de 40 g de Na_2S ou 80 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ por litro podem ser usadas.

g) Solução de hidróxido de sódio a 45%. Dissolver aproximadamente 450 g de NaOH em água, esfriar e diluir a 1 L. Conservar em recipiente plástico.

h) Zinco granulado, p.a.

i) Solução de vermelho de metila a 0,5%. Dissolver 1 g do indicador de vermelho de metila em 200 ml de álcool etílico neutro.

j) Soluções padronizadas de ácido clorídrico ou sulfúrico + - 0,5 N (ou + - 0,1 N quando a quantidade de nitrogênio for pequena).

k) Solução padronizada de hidróxido de sódio + - 0,1 N.

Equipamento:

Digestor e destilador tipo Kjeldahl com dispositivo para regular o aquecimento e, conseqüentemente, a intensidade de digestão.

Procedimento:

a) Transferir uma quantidade de amostra (0,2 a 2,0 g) que contenha no máximo 42 g de N nítrico, para frasco Kjeldahl de 800 ml

b) Juntar 1,7 g de pó de Raney e 150 ml de solução de $H_2SO_4 - K_2SO_4$. Se houver mais de 0,6 g de matéria orgânica, juntar 2,5 ml de solução ácida para cada 0,1 g da matéria orgânica que exceder a 0,6 g.

c) Misturar o conteúdo, imprimindo rotações ao frasco Kjeldahl e colocá-lo sobre o aquecedor frio e que esteja desligado a 10 min. no mínimo. Ligar o aquecedor previamente regulado para o teste de 5 min. Quando iniciar a fervura, reduzir o aquecimento, regulando o digestor para teste de digestão de 10 min.

OBS.: Teste de 5 e 10 minutos equivale a uma intensidade de aquecimento necessário para levar à ebulição 250 ml de água em balão de Kjeldahl de 800 ml, respectivamente, em 5 e 10 minutos.

d) Depois de 10 min., suspender o frasco na posição vertical e juntar 0,7 g de HgO e 15 g de K_2SO_4 .

e) Recolocar o frasco de Kjeldahl na posição inclinada e aumentar o aquecimento regulado para teste de digestão de 5 min (caso haja formação de espuma suspender o Kjeldahl ou diminuir a intensidade de aquecimento). Aquecer, com aquecedor regulado para teste de digestão de 5 min., até os densos fumos brancos de H_2SO_4 tornarem o bulbo do frasco límpido. A digestão está agora completa para amostras contendo somente N amoniacal, nítrico e amídico. Para outras formas de nitrogênio,

agitar, por rotação, o frasco e continuar a digestão por 30 min. (Por 2 horas para amostra contendo material orgânico).

f) Esfriar, juntar 200 ml de água destilada e 25 ml de solução de tiosulfato ou de sulfeto, e homogeneizar.

g) Juntar 3-4 grânulos de zinco, inclinar o frasco de Kjeldahl, adicionar 3,5 ml de solução de NaOH a 45%, para cada ml de solução de H₂SO₄ usado, sem agitar o frasco.

h) Ligar imediatamente o frasco de Kjeldahl ao conjunto de destilação, cuja ponta do condensador já se encontra mergulhada no Erlenmeyer de 500 ml que contém uma quantidade conhecida de ácido padronizado, de acordo com a quantidade provável de nitrogênio e 5 a 7 gotas de vermelho de metila.

OBS.: (Essa quantidade deve conter um número de equivalentes miligramas de ácido tal que exceda de + - 1 o número de equivalentes de N, provável na amostra).

i) Agitar o conteúdo, imprimindo rotações ao frasco Kjeldahl e aquecer para destilar, recebendo, no mínimo 150 ml do destilado, na solução de ácido padronizado.

j) Retirar o frasco de Erlenmeyer e lavar a ponta do condensador.

k) Titular o excesso de ácido com solução de NaOH padronizado.

l) Fazer uma prova em branco em idênticas condições usando 5 ml ou 25 ml da solução

padronizada de ácido 0,5 N ou 0,1 N, respectivamente.

m) Calcular o teor de nitrogênio pela expressão.

Cálculo:

$$\% \text{ de N} = \frac{(V_1N_1 - V_2N_2) - (V_3N_1 - V_4N_2) \cdot 1,4007}{G}$$

onde:

V₁ = Volume de ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o NH₃ (amostra).

N₁ = Normalidade do ácido.

V₂ = Volume de NaOH, expresso em mililitros, gasto na titulação (amostra).

N₂ = Normalidade do NaOH.

V₃ = Volume do ácido, expresso em mililitros, colocado para receber o NH₃ (prova em branco).

V₄ = Volume do NaOH, expresso em mililitros, gasto na titulação (prova em branco).

G = Peso da amostra, em gramas.

Obs.: 1) A absorção de amônia poderá ser feita em 50 ml de ácido bórico a 4%, neste caso a titulação será executada com solução padronizada de ácido 0,1 N. A quantidade de N destilado não deverá ultrapassar 65 mg.

2) Em amostras contendo nitrogênio amídico (Uréia) como única forma de nitrogênio orgânico, pode-se substituir 0,7 g de HgO por 1 g de CuSO₄.5H₂O e dispensar o prolongamento da digestão além dos 30 min.

3.2 FÓSFORO (P₂O₅)

3.2.1 Fósforo total.

Reagentes:

a) Ácido nítrico (HNO₃) p.a.

b) Ácido clorídrico (HCl) p.a.

c) Ácido perclórico (HClO₄) p.a.

d) Reagente "quimociac": Dissolver 70 g de molibdato de sódio di-hidratado (Na₂MoO₄.2H₂O) em 150 ml de água destilada. Dissolver 60 g de ácido cítrico cristalizado (C₆H₈

O₇ .H₂O) em uma mistura de 85 ml de ácido nítrico e 150 ml de água destilada. Esfriar e adicionar aos poucos, com agitação, a solução de molibdato à mistura de ácido cítrico e nítrico. Dissolver 5 ml de quinolina sintética (C₉H₇N) em uma mistura de 35 ml de ácido nítrico e 100 ml de água destilada. Adicionar esta solução, aos poucos, à solução de molibdato, ácido cítrico e nítrico; homogeneizar e deixar em repouso durante 24 horas.

Filtrar, juntar 280 ml de acetona, diluir a 1 litro com água destilada e homogeneizar. GUARDAR ESTA SOLUÇÃO EM FRASCO DE POLIETILENO.

Equipamento:

Cadinho de placa porosa de vidro sintetizado de 30 ml, de porosidade média a fina.

Procedimento:

1. Para extração

A) Aplicável a todos os fertilizantes

a) Transferir 1,0000 g da amostra para copo de 250 ml.

b) Adicionar 25 ml de ácido nítrico e ferver, suavemente, durante 30 a 45 minutos para oxidar toda a matéria orgânica.

c) Esfriar, adicionar 10 a 20 ml de ácido perclórico, ferver com muito cuidado até a solução ficar quase incolor e desprender densos vapores de HClO₄, sem deixar secar, o que poderia provocar explosão (Cuidado). Amostras contendo elevadas quantidades de matéria orgânica deverão ser mantidas em ebulição, no mínimo, por mais de 1 hora após o início de desprendimento de vapores de ácido perclórico, repondo este ácido, se necessário.

d.) Deixar esfriar parcialmente e então adicionar 50 ml de água, ferver por 5 minutos. Esfriar .

e) Transferir o líquido para um balão volumétrico de 250 ml e completar o volume com água. Homogeneizar .

f) Filtrar através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco. Desprezar os primeiros 20 a 30 ml e separar, em seguida, o volume de filtrado límpido, suficiente para a determinação.

B) Aplicável a fertilizantes, contendo baixa quantidade de matéria orgânica

a) Transferir 1 ,0000 g de amostra para copo de 250 ml, adicionar 30 IT de ácido nítrico e 5 ml de ácido clorídrico. Ferver até destruir toda matéria orgânica. Adicionar 50 ml de água destilada e ferver por minutos. Esfriar.

b) Transferir para balão volumétrico de 250 ml e completar o volume com água destilada. Homogeneizar .

c) Filtrar através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco. Desprezar os primeiros 20 a 30 ml e separar, em seguida, (volume de filtrado límpido, suficiente para a determinação).

1. Para determinação:

a) Pipetar uma alíquota do extrato contendo de 10 a 25 mg de P₂O₅ e transferir para copo de 400 a 600 ml. Diluir, se necessário, a 100 ml com água destilada e aquecer até o início da fervura.

b) Adicionar 50 ml de reagente "quimociac" e ferver durante 1 minuto, dentro da capela.

Esfriar a temperatura ambiente, agitando cuidadosamente, 3 a 4 vezes durante o resfriamento.

d) Filtrar, sob a ação de vácuo, em cadinho de placa porosa, previamente seco a 250°C e tarado; lavar com 5 porções de 25 ml de água destilada, tendo o cuidado de adicionar cada porção após a anterior ter passado completamente.

e) Secar durante 30 minutos a 250°C. Esfriar em dessecador e pesar como $(C_9H_7N)_3H_3$ [po₄.12 M₆O₃]

f) Calcular o percentual de P₂O₅ da amostra, utilizando a seguinte expressão:

$$\%P_2O_5 \text{ total} = \frac{m \times 801,75}{V}$$

onde:

m = massa (g) do precipitado.

v = volume (ml) da alíquota do extrato usado na determinação.

3.2.2 Fósforo Solúvel em Água

Reagentes:

a) Ácido nítrico (HNO₃) p.a.

b) Reagente "quimociac": Dissolver 70 g de molibdato de ódio di-hidratado (Na₂MoO₄ .2H₂O) em 150 ml de água destilada. Dissolver 60 g de ácido cítrico (C₆H₈O₇ .H₂O) cristalizado em uma mistura de 85 ml de ácido nítrico e 150 ml de água destilada. Esfriar e adicionar aos poucos com agitação, a solução de molibdato à mistura de ácido cítrico e nítrico. Dissolver 5 ml de quinolina sintética (C₉ H₇N) em uma mistura de 35 ml de ácido nítrico e 100 ml de água destilada. Adicionar esta solução, aos poucos, à solução de molibdato, ácido cítrico e nítrico; homogeneizar e deixar em repouso durante 24 horas. Filtrar, juntar 280 ml de acetona, diluir a 1 litro com água destilada e homogeneizar. Guardar esta solução em frasco de polietileno.

Equipamento:

Cadinho de placa porosa de vidro sintetizado de 30 ml, de porosidade média a fina.

Procedimento:

1. Para extração

a) Transferir 1,0000 g da amostra para papel de filtro de 9 cm de diâmetro (S&S 589, faixa branca ou equivalente), adaptado em funil e colocar sobre um balão volumétrico de 250 ml.

b) Lavar com pequenas porções sucessivas de água destilada tendo o cuidado de promover a suspensão da amostra e de adicionar nova porção após a anterior ter passado completamente; proceder à extração até obter um volume de quase 250 ml. A extração deve estar completa em 1 hora, caso contrário, usar vácuo no final da extração. Se o filtrado apresentar turbidez, adicionar ao mesmo 1 a 2 ml de HNO₃.

c) Completar o volume com água destilada e homogeneizar .

2. Para Determinação

a) Pipetar uma alíquota do extrato contendo de 10 a 25 mg de P₂O₅ e transferir para copo de 400 a 600 ml.

Diluir, se necessário, a 50 ml com água destilada.

b) Acrescentar 10 ml de ácido nítrico 1:1 e ferver suavemente durante 10 minutos.

c) Diluir a 100 ml com água destilada e aquecer até início de fervura.

d) Adicionar 50 ml de reagente "quimociac" e ferver durante 1 minuto, dentro da capela.

- e) Esfriar à temperatura ambiente, agitando cuidadosamente, 3-4 vezes durante o resfriamento.
- f) Filtrar, sob a ação de vácuo, em cadinho de placa porosa, previamente seco a 250°C e tarado; lavar com 5 porções de 25 ml de água destilada, tendo o cuidado de adicionar cada porção após a anterior ter passado completamente.
- g) Secar durante 30 minutos a 250°C. Esfriar em dessecador e pesar como $(C_9H_7N)_3H_3$ [po₄.12 M₆O₃]
- h) Calcular o percentual de P₂O₅ da amostra, utilizando a seguinte expressão:

$$\%P_2O_5 \text{ total} = \frac{m \times 801,75}{V}$$

onde:

m = massa (g) do precipitado.

v = volume (ml) da alíquota do extrato usada na determinação.

3.2.3 Fósforo Solúvel em Água mais Fósforo Solúvel em Solução Neutra de Citrato de Amônio

Reagentes:

- a) Acido nítrico (HNO₃) p.a.
 b) Acido clorídrico (HCl) p.a.
 c) Quimociac:

Dissolver 70 g de molibdato de sódio di-hidratado (Na₂MoO₄ · 2H₂O) em 150 ml de água destilada.

Dissolver 60 g de ácido cítrico cristalizado (C₆H₈O₇ · H₂O) em uma mistura de 85 ml de ácido nítrico e 150 ml de água destilada. Esfriar e adicionar aos poucos com agitação a solução de molibdato à mistura de ácido cítrico e nítrico. Dissolver 5 ml de quinolina sintética (C₉H₇N) em uma mistura de 35 ml ácido nítrico e 100 ml de água destilada. Adicionar esta solução aos poucos à solução de molibdato, ácido cítrico e ácido nítrico; homogeneizar e deixar em repouso durante 24 horas. Filtrar, juntar 280 ml de acetona, diluir a 1 litro com água destilada e homogeneizar .

OBS: GUARDAR ESTA SOLUÇÃO EM GARRAFA DE POLIETILENO.

d) Solução de citrato de amônio de densidade 1,09 e pH = 7,0. Dissolver 370 g de ácido cítrico cristalizado, (C₆ H₈ O₇ · H₂O) em 1,5 litros de água destilada e adicionar 345 ml de hidróxido de amônio (28% a 29% de NH₃). Esfriar e determinar o pH potenciométricamente. Ajustar o pH a 7,0 (+ - 0,05) com hidróxido de amônio (1 + 7) ou com solução de , ácido cítrico a 10%

Determinar a densidade, que deve ser de 1,09 à temperatura de 20°C, adicionando água, se necessário.

Guardar a solução em frasco hermeticamente fechado. Verificar, semanalmente, o Ph acertando quando necessário.

e) Solução de nitrato de amônio a 5%.

Equipamento:

-Cadinho de placa porosa de vidro sintetizado de 30 ml, de porosidade média a fina.

-Estufa regulada a 65°C, tendo no seu interior um agitador que proporcione uma agitação contínua da solução, de forma a que a mesma banhe as paredes internas do Erlenmeyer e de sua rolha, Pode-se substituir a estufa por banho maria a 65°C que contenha um aparelho de agitação.

Procedimento:

A) Método indireto

Neste método deve-se determinar, à parte, o $P_2 O_5$ total, conforme descrito em 3.2.1.

1. Para extração, em amostras contendo compostos solúveis em água:

a) Transferir 1,0000 g da amostra para papel de filtro de 9 cm de diâmetro (S&S 589, faixa branca ou equivalente) adaptado em funil e colocar sobre um balão volumétrico de 250 ml.

b) Lavar com pequenas porções sucessivas de água destilada, tendo o cuidado de promover a suspensão da amostra e de adicionar nova porção de água após a anterior ter passado completamente; proceder à extração até obter um volume de quase 250 ml.

A extração deve estar completa em 1 hora, caso contrário, usar vácuo, no final da extração.

c) Transferir o papel de filtro com o resíduo, dentro do prazo máximo de 1 hora, para um frasco de Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de solução de citrato de amônio, previamente aquecida a 65°C.

d) Tampar o frasco com uma rolha de borracha, agitar vigorosamente até reduzir o papel à polpa e remover, momentaneamente, a rolha para diminuir a pressão.

e) Colocar o frasco bem fechado, no agitador e agitar durante 1 hora, mantendo a temperatura de 65°C

f) Após exatamente 1 hora, retirar o frasco do agitador e filtrar imediatamente, à vácuo, através de papel Whatman nº 5 ou equivalente.

g) Lavar com porções de água destilada a 65°C, adicionando nova porção de água após a anterior ter passado completamente, até o volume do filtrado atingir cerca de 350 ml. Se o material produzir filtrado turvo, a lavagem deverá ser feita com solução de nitrato de amônio a 5%, a 65°C.

h) Transferir o papel contendo o resíduo para um copo de 250 ml.

i) Adicionar 30 ml de ácido nítrico e 5 ml de ácido clorídrico. Ferver até destruir a matéria orgânica, proceder da seguinte maneira:

Adicionar 25 ml de ácido nítrico e ferver, suavemente, durante 35 a 45 minutos para oxidar toda matéria orgânica. Esfriar, adicionar 10 ml a 20 ml de ácido perclórico, ferver com muito cuidado até a solução ficar quase incolor e desprender densos vapores de ácido perclórico, sem deixar secar, o que poderia provocar explosão (Cuidado). Amostras contendo elevadas quantidades de matéria orgânica deverão ser mantidas em ebulição, no mínimo, por mais de 1 hora após o início do despreendimento dos vapores de ácido perclórico, repondo esse ácido, se necessário.

j) Adicionar 50 ml de água, ferver por 5 minutos e esfriar.

k) Passar para balão volumétrico de 200 ml ou de outro volume tal que permita uma diluição mais adequada. Esfriar, completar o volume e agitar.

l) Filtrar através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco.

2. Para extração, em amostras não contendo compostos solúveis em água:

a) Transferir 1,000 g da amostra para papel de filtro S & S 589, faixa branca ou equivalente, seco.

b) Transferir o papel de filtro com a amostra para um frasco de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de solução de citrato de amônio, previamente aquecida a 65°C.

c) Tampar o frasco com uma rolha de borracha, agitar vigorosamente até reduzir o papel de filtro à polpa e remover, momentaneamente, a rolha para diminuir a pressão.

d) Colocar o frasco bem fechado no agitador e agitar durante 1 hora, mantendo a temperatura de 65°C.

- e) Após exatamente 1 hora, retirar o frasco do agitador e filtrar imediatamente, à vácuo, através de papel Whatman nº 5 ou equivalente.
- f) Lavar com porções de água destilada a 65°C, adicionando nova porção de água após a anterior ter passado completamente, até o volume do filtrado atingir cerca de 350 ml. Se o material produzir filtrado turvo, a lavagem deverá ser feita com solução de nitrato de amônio a 5%, a 65°C.
- g)-Transferir o papel contendo o resíduo para um copo de 250 ml.
- h) Adicionar 30 ml de ácido nítrico e 5 ml de ácido clorídrico. Ferver até .destruir a matéria orgânica. Caso o resíduo contenha muita matéria orgânica, proceder da seguinte maneira:
Adicionar 25 ml de ácido nítrico e ferver, suavemente, durante 30 a 45 minutos, para oxidar toda a matéria orgânica. Esfriar, adicionar 10 ml de ácido perclórico, ferver com muito cuidado até a solução ficar quase incolor e desprender densos vapores de ácido perclórico, sem deixar secar, o que poderia provocar explosão (Cuidado). Amostras contendo elevadas quantidades de matéria orgânica deverão ser mantidas em ebulição, no mínimo, por mais de 1 hora após o início do desprendimento dos vapores de ácido perclórico, repondo este ácido, se necessário.
- i) Adicionar 50 ml de água destilada, ferver por 5 minutos e esfriar .
- j) Passar para balão volumétrico de 200 ml ou de outro volume tal que permita uma diluição mais adequada. Esfriar, completar o volume e agitar .
- k) Filtrar através de papel de filtro S& S 589, faixa branca ou equivalente, seco.

3. Para determinação:

- a) Pipetar uma alíquota contendo no .máximo 25 mg de P₂O₅ e transferir para copo de 400 a 600 ml. Diluir, se necessário, a 100 ml com água destilada e aquecer até início de fervura.
- b) Adicionar 50 ml do reagente "Quimociac" e ferver durante 1 minuto, dentro de capela.
- c) Esfriar à temperatura ambiente, agitando cuidadosamente, 3-4 vezes durante o resfriamento.
- d) Filtrar em cadinho de placa porosa de vidro sintetizado, previamente seco a 250°C e tarado, lavar com 5 porções de 25 ml de água 'destilada, tendo cuidado de adicionar cada porção após a anterior ter passado completamente.
- e) Secar durante 30 minutos a 250°C. Esfriar em dessecador e pesar como (C₉H₇N)₃H₃[PO₄ .12MoO₃).
- f) Calcular o percentual de P₂O₅ insolúvel em citrato de amônio, utilizando a expressão:

$$\% \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ insolúvel em citrato de amônio} = \frac{=3,207 \times M \times V}{V_1}$$

onde:

M = massa (g) do precipitado.

V = volume (ml) a que foi diluído o extrato.

V₁ = volume (ml) da alíquota do extrato usado na determinação.

- g) Calcular o percentual de P₂O₅ solúvel em água mais o de P₂O₅ solúvel em solução neutra de citrato de amônio, utilizando a expressão:

$$\% \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ solúvel em água mais o solúvel em solução neutra de citrato de amônio} = \% \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ total} - \% \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ insolúvel em citrato de amônio.}$$

B- Método direto

1. Para extração em amostras contendo compostos solúveis em água:

- a) Transferir 1,0000 g da amostra para papel de filtro de 9 cm de diâmetro, S&S 589, faixa branca ou equivalente, adaptado em funil e colocar sobre um balão volumétrico de 500 ml.
- b) Lavar com 12 porções de 10 ml de água destilada, tendo o cuidado de promover a suspensão da amostra e de adicionar nova porção, após a anterior ter passado completamente.
- c) Transferir o papel de filtro com o resíduo para erlenmeyer de 250 ml e lavar o funil com 10 ml de água destilada, recolhendo-a no mesmo balão volumétrico.
- d) Adicionar ao erlenmeyer 100 ml de solução de citrato de amônio previamente aquecida a 65°C.
Tampar o frasco com uma rolha de borracha, agitar vigorosamente até reduzir o papel de filtro à polpa e remover, momentaneamente, a rolha para diminuir a pressão.
- e) Colocar o frasco bem fechado no agitador e agitar durante 1 hora, mantendo a temperatura de 65°C.
- f) Após exatamente 1 hora retirar o frasco do agitador e transferir o conteúdo do erlenmeyer para o balão volumétrico de 500 ml que contém o solúvel em água.
- g) Esfriar imediatamente à temperatura ambiente, completar o volume e agitar.
- h) Deixar em repouso, no mínimo, 2 horas antes de retirar a alíquota.

2. Para extração, em amostras não contendo compostos solúveis em água:

- a) Transferir 1,0000 g da amostra para papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco.
- b) Transferir o papel de filtro com a amostra para erlenmeyer de 250 ml e adicionar 100 ml de solução de citrato de amônio previamente aquecida a 65°C. Tampar o frasco com uma rolha de borracha, agitar vigorosamente até reduzir o papel de filtro à polpa e remover, momentaneamente, a rolha para diminuir a pressão.
- c) Colocar o frasco bem fechado, no agitador, agitar durante 1 hora, mantendo a temperatura de 65°C.
- d) Após exatamente 1 hora, retirar o frasco do agitador e transferir o conteúdo do erlenmeyer para um balão volumétrico de 500 ml.
- e) Esfriar imediatamente à temperatura ambiente, completar o volume e agitar
- f) Deixar em repouso no mínimo 2 horas antes de retirar a alíquota.

3. Para determinação

- a) Pipetar uma alíquota do extrato contendo 10 mg a 25 mg de P_2O_5 e menos de 10 ml da solução original de citrato e transferir para copo de 400 a 600 ml. Diluir, se necessário, a 50 ml com água destilada.
- b) Acrescentar 10 ml de ácido nítrico 1:1 e ferver suavemente durante 10 minutos.
- c) Diluir a 100 ml com água destilada e aquecer até início de fervura.
- d) Adicionar 50 ml do reagente "Quimociac" e ferver durante 1 minuto, dentro de capela.
- e) Esfriar a temperatura ambiente, agitando cuidadosamente, 3-4 vezes durante o resfriamento.
- f) Filtrar, sob a ação de vácuo, em cadinho de placa porosa, previamente seco a 250°C e tarado, lavar com 5 porções de 25 ml de água destilada, tendo o cuidado de adicionar cada porção após a anterior ter passado completamente.
- g) Secar durante 30 minutos a 250°C. Esfriar em dessecador e pesar como $(C_9H_7N)_3H_3[PO_4 \cdot 12MoO_3]$.
- h) Calcular o percentual de P_2O_5 solúvel em água mais o de P_2O_5 solúvel em solução neutra de citrato de amônio, utilizando a expressão :
 $\% P_2O_5 \text{ solúvel em água} + \% P_2O_5 \text{ solúvel em citrato de amônio} =$

$$= 1.603,5 \times M$$

V

onde:

M = massa (g) do precipitado.

V = volume (ml) da alíquota do extrato usado na determinação.

3.2.4 Fósforo solúvel em ácido cítrico a 2%, relação 1:100.

Reagentes

a) Ácido nítrico (HNO_3) p.a.

b) Reagente "Quimociac":

Dissolver 60 g de ácido cítrico cristalizado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em uma mistura de 85 ml de ácido nítrico e 150 ml de água destilada.

Esfriar e adicionar aos poucos, com agitação, a solução de molibdato à mistura de ácidos cítrico e nítrico.

Dissolver 5 ml de quinolina sintética ($\text{C}_9\text{H}_7\text{N}$) em uma mistura de 35 ml de ácido nítrico e 100 ml de água destilada. Adicionar esta solução aos poucos, à solução de molibdato, ácidos cítrico e nítrico; homogeneizar e deixar em repouso durante 24 horas. Filtrar, juntar 280 ml de acetona, diluir a 1 litro com água destilada e homogeneizar. Guardar esta solução em frasco de polietileno.

Solução de ácido cítrico a 2%

Pesar 20,0 g de ácido cítrico cristalizado p.a ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolver em água destilada, transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar o volume. Preservar esta solução ou usa-la sempre recém-preparada.

EQUIPAMENTO

Cadinho de placa porosa de vidro sintetizado de 30 ml, com porosidade apropriada de média a fina. Agitador de rotação tipo Wagner, com regulagem de 30 a 40 rpm. Garrafa de Stohman de 500 ml, ou equivalente.

Procedimento

1. Para extração:

- a) Transferir 5,0000 g da amostra para garrafa de Stohman, seca
- b) Completar o volume com solução de ácido cítrico, recém-preparada, à temperatura de 25°C , colocar imediatamente no agitador e agitar durante 30 minutos.
- c) Filtrar imediatamente através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, de 12,5 cm de diâmetro. Desprezar os primeiros 20-30 ml e separar, em seguida, um volume de filtrado límpido, suficiente para a determinação.

2. Para determinação:

- a) Pipetar uma alíquota de extrato contendo de 10 a 25 mg P_2O_5 e transferir para copo de 400 ml a 600 ml. Diluir, se necessário, a 50 ml com água destilada.
- b) Acrescentar 10 ml de ácido nítrico 1:1 e ferver suavemente durante 10 minutos.
- c) Diluir a 100 ml com água destilada e aquecer até início de fervura.
- d) Adicionar 50 ml de reagente "quimociac" e ferver durante 1 minuto, dentro da capela.
- e) Esfriar à temperatura ambiente, agitando cuidadosamente, 3-4 vezes durante o resfriamento.
- f) Filtrar, sob a ação de vácuo, em cadinho de placa porosa previamente seco a 250°C e tarado; lavar com 5 porções de 25 ml de água destilada, tendo o cuidado de adicionar cada porção após a anterior ter passado completamente.

g) Secar durante 30 minutos a 250°C. Esfriar em dessecador e pesar como: $(C_9H_7N)_3H_3[PO_4 \cdot 12MoO_3]$

h) Calcular o percentual de P_2O_5 solúvel em solução de ácido cítrico, utilizando a expressão:

$$\% P_2O_5 = \frac{m \times 320,7}{V}$$

onde:

m = massa (g) do precipitado.

v = volume (ml) da alíquota do extrato usado na determinação.

3.3 POTÁSSIO (K_2O)

A) Método do tetrafenilborato de sódio

Reagentes:

a) Solução de hidróxido de sódio NaOH a 20%.

b) Formaldeído H_2CO p.a. a 37%.

c) Solução de oxalato de amônio $(NH_4)_2C_2O_4$ a 4%.

d) Solução do indicador amarelo de Clayton. Dissolver 0,040 g de amarelo de Clayton (amarelo de titânio CI 19540) em água e completar a 100 ml. Homogeneizar.

e) Solução de cloreto de benzalcônio: Preparar uma solução aquosa contendo aproximadamente 0,63% de cloreto de benzalcônio (Zefiran) ou brometo de cetiltrimetil amônio. A dissolução deve ser feita a quente. No caso do cloreto de benzalcônio, pode-se partir de soluções comerciais concentradas encontradas normalmente em fornecedores de produtos farmacêuticos. A equivalência entre esta solução e a de TFBS deve ser aproximadamente 2 para 1 em volume.

Para determinar a relação entre as soluções, em volume, transferir para erlenmeyer de 125 ml: 25 ml de água, 1 ml de hidróxido de sódio a 20%, 2,5 ml de formaldeído a 37%, 1,5 ml de solução de oxalato de amônio, acrescentar 4,0 ml de solução de tetrafenilborato de sódio, 6 a 8 gotas de indicador e titular com a solução de cloreto de benzalcônio até a viragem para a cor rosada, usando uma bureta semi-micro (V_1). Em seguida calcular o fator de equivalência do volume da solução de TFBS correspondente a 1 ml de solução de cloreto de benzalcônio, pela expressão:

$$F1 = \frac{4}{V_1}$$

onde:

V_1 = volume gasto de solução de cloreto de benzalcônio em ml. O fator deverá ser aproximadamente de 0,5.

g) Fosfato monopotássico KH_2PO_4 p.a. padrão primário:

Secar a 105°C durante 2 horas e esfriar em dessecador. Preparar uma solução padrão de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) dissolvendo 2,500 g em água, adicionar 50 ml da solução de oxalato de amônio a 4%, completar o volume a 250 ml com água destilada. Homogeneizar.

h) Solução de tetrafenilborato de sódio NaB $(C_6H_5)_4$, padronizada:

Dissolver 12 g de tetrafenilborato de sódio, p.a., em 800 ml de água, adicionar 20 a 25 g de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$, agitar durante 5 minutos e filtrar em papel de filtro Whatman 42 ou equivalente. Caso o filtrado inicialmente se apresentar turvo, refiltrá-lo. Adicionar 2 ml de hidróxido de sódio a 20% ao

filtrado límpido e completar a 1 litro. Homogeneizar e deixar em repouso em recipiente de polietileno durante 2 dias antes da padronização.

Para padronizar a solução, transferir uma alíquota de 15 ml da solução padrão de KH_2PO_4 medida com uma pipeta volumétrica ou uma bureta semi-micro, contendo 51,92 mg de K_2O , para um frasco volumétrico de 100 ml, adicionar 2 ml de NaOH a 20%, 5 ml de formaldeído a 37% e 43,00 ml da solução de tetrafenilborato de sódio. Agitar lentamente evitando a formação de espuma. Completar o volume com água destilada, homogeneizar e após 10 minutos, filtrar através de papel de filtro S&S 589, faixa azul ou equivalente, seco. Transferir uma alíquota de 50 ml de filtrado para um erlenmeyer de 250 ml e adicionar 6 a 8 gotas do indicador amarelo de Clayton. Titular o excesso da solução de tetrafenilborato de sódio, até a viragem para a cor rosada, com a solução de cloreto de benzalcônio usando uma bureta semi-micro (V_2). Em seguida, calcular o fator correspondente a mg de K_2O por ml da solução de TFBS, usando a expressão:

$$F_2 = \frac{51,92}{43,00 - 2 (V_2 \times F_1)}$$

onde:

V_2 = volume gasto de cloreto de benzalcônio em ml.

F_1 = fator da solução de cloreto de benzalcônio.

Procedimento:

- Transferir 2,5 g da amostra ou 1,25 g se o teor de K_2O for maior que 50%, para um copo de 400 ml, adicionar 50 ml de solução de oxalato de amônio a 4%, e 125 ml de água, ferver suavemente durante 30 minutos. Se a amostra contiver matéria orgânica, juntar 2 g de carvão ativo, isento de K_2O , antes da fervura.
 - Esfriar, transferir para um frasco volumétrico de 250 ml, completar o volume e homogeneizar .
 - Filtrar através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco para um copo seco, desprezando os primeiros 20-30 ml.
 - Transferir uma alíquota contendo 10 a 40 mg de K_2O para um frasco volumétrico de 100 ml, adicionar 2 ml de NaOH a 20% e 5 ml de formaldeído a 37%. Homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos.
 - Adicionar 1 ml da solução de tetrafenilborato de sódio para cada 1,5 mg de K_2O esperado e mais um excesso de 8 ml para garantir a precipitação (V_3 -Volume total). Completar o volume com água, agitar energicamente e após 10 minutos, filtrar em papel de filtro S&S 589, faixa azul ou equivalente, seco.
 - Transferir uma alíquota de 50 ml do filtrado para um erlenmeyer de 250 ml, adicionar 6 a 8 gotas do indicador amarelo de Clayton e titular com a solução padrão de cloreto de benzalcônio, usando bureta semi-micro, até a viragem para a cor rosada (V_4).
- g) Calcular a percentagem de K_2O , usando a expressão:

$$\% \text{K}_2\text{O} = \frac{F_2[V_3 - (2 \times V_4 \times F_1)] \times 100}{m}$$

onde:

V_3 = volume em ml de solução de TFBS adicionado.

V_4 = volume em ml da solução de cloreto de benzalcônio gasto na titulação.

m = massa (mg) da amostra contida na alíquota.

F_1 = fator da solução de cloreto de benzalcônio.

F_2 = fator da solução de TFBS.

B) Método de fotometria de chama

Reagentes:

a) Solução padrão de K_2O :

Pesar exatamente 6,3310 g de cloreto de potássio (KCl) p.a., previamente seco em estufa a $100^\circ C$, durante 2 horas, e esfriado em dessecador. Dissolver com água destilada, em balão volumétrico de 2 litros; completar o volume com água e homogeneizar (solução estoque). Pipetar 20 ml da solução estoque e passar para o balão volumétrico de 500 ml, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Pipetar 100 ml desta solução, passar para balão volumétrico de 500 ml, completar o volume com água e homogeneizar. Esta solução contém 16 ppm de K_2O e é usada como padrão.

Obs.: Empregar para todas as operações, inclusive para armazenar água destilada, recipientes de vidro de baixo teor de álcalis (pirex ou similar), ou plástico, a fim de evitar a contaminação com potássio. .

Equipamento:

Fotômetro de chama, equipado para medir emissão de potássio.

Procedimento:

1. Para fertilizantes simples cloreto de potássio e sulfato de potássio:

- Pesar 1,3300 g se a amostra, for de cloreto de potássio ou 1,6000 se for de sulfato de potássio. Passar para balão volumétrico de 500 ml completar o volume com água e homogeneizar.
- Filtrar em papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco, recebendo o filtrado em recipiente seco e desprezar os primeiros 20 a 30ml.
- Pipetar 5 ml desta solução, passar para balão volumétrico de 500 ml, . completar o volume com água e homogeneizar .
- Ajustar o fotômetro de chama em "80" (escala centesimal) com a solução padrão de 16 ppm de K_2O , usando água destilada para zerar o aparelho. Medir o valor da emissão do potássio empregando a solução da amostra.
- Calcular o percentual de K_2O , usando a expressão:

$$\% K_2O = \frac{\text{leitura da solução da amostra}}{\text{peso inicial da amostra (g)}}$$

- Caso a leitura encontrada tenha sido abaixo de 75 ou acima de 85, o resultado (% K_2O) obtido no item e, é considerado aproximado. Deve-se repetir, então, a análise com um novo peso da amostra, calculada pela expressão:

$$p = \frac{80}{\% K_2O \text{ aproximado}}$$

2. Para misturas de fertilizantes e sulfato duplo do magnésio o potássio:

- Pesar "p" gramas da amostra calculada pela expressão:

$$p = \frac{40}{\% K_2O \text{ provável}}$$

- Passar para copo de 400 ml, juntar 100 ml de água e ferver por 5 minutos.
- Esfriar e transferir para balão volumétrico de 000 ml e homogeneizar.
- Filtrar em papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente, seco, recolhendo o filtrado em recipiente seco e desprezando os primeiros 20 a 30 ml.
- Pipetar 5 ml, passar para balão volumétrico de 250 ml, completar o volume com água e homogeneizar.

- f) Ajustar o fotômetro de chama em "80" (escala centesimal) com a solução padrão de 16 ppm de K_2O , usando água destilada para zerar o aparelho. Medir o valor da emissão do potássio empregando a solução da amostra.
- 91 Calcular a % K_2O , pela expressão:

$$\% K_2O = \frac{L \times 0,5}{p}$$

sendo:

L = leitura da solução da amostra.
P = peso (g) da amostra.

- h) Caso a leitura encontrada tenha sido abaixo de 75 ou acima de 85, o resultado (% K_2O) obtido no item 9 e considerado aproximado. Deve-se repetir então, a análise, recalculando o peso "p" da amostra, usando o percentual aproximado, encontrado.

3.4 Cálcio

A) Método permanganométrico
Reagentes:

- a) Ácido nítrico (HNO_3) p.a.
b) Ácido clorídrico (HCl) p.a.
c) Solução de bromofenol azul a 0,2%.

Transferir 0,10 g de bromofenol azul para um gral de porcelana; adicionar 3 ml de solução de NaOH 0,05N, aos poucos (porções de 0,2-0,3 ml, homogeneizando até dissolver o material sólido).

Transferir para um balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com água destilada e agitar.

- d) Solução de amônio (1 + 4).
e) Solução de ácido clorídrico (1 + 4).

f) Solução saturada de oxalato de amônio.

Adicionar 80 g de $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$ a 1 litro de água destilada contido em recipiente de vidro com rolha esmerilhada, agitar e deixar em repouso 12 a 18 horas.

g) Solução de permanganato de potássio, $KMnO_4$ 0,1 N ou 0,05N, padronizada.

Dissolver 3,2 g ou 1,6 g, respectivamente, de $KMnO_4$ p.a., em 1 litro d'água destilada, ferver por uma hora, cobrir com vidro de relógio e deixar em repouso durante 12 a 18 horas.

Filtrar, com sucção, através de funil com placa filtrante de vidro sinterizado, recebendo o filtrado em recipiente de vidro escuro, (o funil e o frasco devem ser lavados previamente com solução sulfocrômica).

Padronização: Transferir 0,2000 g ou 0,1500 g oxalato de sódio ($Na_2 C_2 O_4$), padrão primário (seco a $105^\circ C$ por 1 hora) para erlenmeyer de 500 ml; acrescentar 250 ml de solução de H_2SO_4 (5 + 95) previamente fervido por 15 minutos e esfriado à temperatura ambiente. Transferir a solução de $KMnO_4$ para uma bureta; adicionar 25 ml ou 40 ml, respectivamente, dessa solução para dentro do erlenmeyer durante 60-90 segundos, com agitação contínua; deixar em repouso até a cor desaparecer (caso não desapareça, repetir adicionando menor volume de $KMnO_4$). Aquecer a solução do erlenmeyer a $50-60^\circ C$ e prosseguir a titulação até uma leve cor rósea persistir por 30 segundos, adicionando, no final, gota a gota, esperando cada gota perder completamente a cor antes da adição da próxima.

Calcular a normalidade pela expressão:

$$N = \frac{m}{0,067.V}$$

sendo:

m = massa (g) de oxalato de sódio.

v = volume (ml) da sol. de KMnO_4 gasto na titulação.

Procedimento:

a) Transferir 1,0000 g a 2,5000 g da amostra para um copo de 250 ml, adicionar 10 a 30 ml de HNO_3 e 5 a 10 ml de HCl , cobrir com vidro de relógio e ferver durante 30 minutos.

b) Adicionar 70-80 ml de água destilada, filtrar, se necessário, para balão de 250 ml, através de papel S&S 589, faixa branca ou equivalente.

c) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume e agitar.

d) Transferir uma alíquota de 25 ml a 50 ml da solução para um copo de 250 ml ou 400 ml, adicionar 70-80 ml de água destilada e homogeneizar.

e) Adicionar 4 gotas da solução de bromofenol azul a 0,2%, solução de amônia (1 + 4), aos poucos, até o indicador passar da cor amarela a verde (pH 3,5 a 4,0) e adicionar mais 40-50 ml de água destilada.

Obs.: Pode ser usado o indicador vermelho de metila em solução alcóolica a 0,2% (0,2 g do indicador em 100 ml de álcool etílico) e a mudança de cor deverá ser de vermelha para rosa (pH 3,5-4,0).

f) Aquecer até quase atingir a ebulição e adicionar aos poucos, 30 ml de solução saturada de oxalato de amônio a 85-90°C, agitando continuamente.

g) Manter o pH da solução indicado pela cor verde do indicador (ou cor rósea, se o indicador for vermelho de metila) através do emprego da solução de NH_3 (1 + 4) ou de HCl (1 + 4).

h) Deixar em banho-maria durante 1 hora e esfriar, mantendo sempre o pH indicado.

i) Filtrar através do papel S&S 589, faixa branca ou equivalente ou de cadinho com fundo de vidro sinterizado de porosidade média para um frasco de erlenmeyer de 300 ml ou para um frasco de filtração a vácuo, de 300ml.

j) Lavar o precipitado com 10 porções de água quente (70-80°C), de 10 ml cada uma.

k) Retirar o recipiente (frasco de erlenmeyer, ou frasco para filtração a vácuo) que recebeu o filtrado, conservando o seu conteúdo para a determinação gravimétrica do magnésio, e substituir por outro similar.

l) Dissolver o oxalato de cálcio com 10 porções de 10 ml cada uma, de solução de H_2SO_4 (1 + 9) a 70 a 80°C.

m) Titular a 70-80°C com a solução 0,1 N ou 0,05N de permanganato de potássio.

n) Desenvolver uma prova em branco.

o) Calcular o percentual de cálcio pela expressão:

$$\%Ca = \frac{(V_1 - V_2) N_1 \cdot 2,004}{P_1}$$

sendo:

V_1 = volume (ml) da solução de permanganato gasto na titulação da amostra.

V_2 = volume (ml) da solução de permanganato gasto na prova em branco.

N_1 = normalidade da solução de KMnO_4

P_1 = peso (g) da amostra contida na alíquota pipetada no item d.

B) Método quelatométrico da EDTA

(Aplicável a amostras com teor de Mn ou Zn igual ou inferior a 0,2%).

Reagentes:

a) Solução de hidróxido de potássio a 20%.

Transferir 100 g de KOH para copo de 600 ml, dissolver com 400 ml de água destilada, passar para balão de 500 ml, esperar esfriar, completar o volume e agitar.

b) Solução de hidróxido de potássio e cianeto de potássio. (CUIDADO VENENOSO).

Dissolver 280 g de hidróxido de potássio (KOH) e 66 g de cianeto (KCN) em 1 litro de água destilada.

c) Indicador: calceína ou calcon ou murexida.

- Calceína: Moer a mistura formada de 0,2 g de calceína, 0,12 g de timolftaleína e 20 g de nitrato de potássio (KNO₃).

- Solução de calcon a 0,5%: Transferir 100 mg de calcon para copo de 100 ml, contendo 10 ml de trietanolamina e 10 ml de álcool metílico. Esperar dissolver, transferir para recipiente de plástico e conservar em geladeira (duração de 30-45 dias).

- Murexida: Moer a mistura formada de 0,1 g de murexida e 10 g de cloreto de sódio (NaCl). Conservar em frasco escuro, bem fechado.

d) Solução de sulfato duplo de ferro III e amônio a 13,6%.

Transferir 68 g de sulfato duplo de ferro III e amônio, FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O, para um copo de 600 ml contendo 400 ml de água destilada e 2,5 ml de H₂SO₄ agitar para dissolver, passar para um balão de 500 ml, filtrando caso a solução não se apresente límpida. Completar o volume e agitar.

e) Solução padrão de cálcio contendo 1,0 mg de Ca/ml.

Transferir 2,4973 g de carbonato de cálcio, padrão primário, previamente seco a 285°C, durante 2 horas, para balão volumétrico de 1 litro, dissolver com 70-80 ml de solução de HCl (1 + 10), completar o volume com água desmineralizada ou bi-distilada e agitar.

f) Solução aquosa de trietanolamina (1 + 1).

g) Solução de ferrocianeto de potássio a 4%. Dissolver 4,0 g de K₄Fe(CN)₆·3H₂O em 100 ml de água destilada.

h) Solução de EDTA A dissódico a 0,4%.

Dissolver 4,0 g de sal dissódico do EDTA em 400-500 ml de água destilada, transferir para um balão volumétrico de 1 litro, completar o volume e agitar.

Padronização da solução EDTA a 0,4%.

Transferir por meio de pipeta, 10 ml da solução padrão de cálcio, para um frasco de erlenmeyer de 300 ml. Adicionar 100 ml de água destilada, 10 ml de solução de hidróxido de potássio e cianeto de potássio, 2 gotas de solução de trietanolamina, 5 gotas de solução de ferrocianeto de potássio e 15 ± 1 mg do indicador calceína, ou 6 gotas de solução do indicador calcon ou 0,2-0,4 g do indicador murexida, agitando após a adição de cada reagente. Titular imediatamente com a solução do EDTA a 0,4%, agitando continuamente até a mudança permanente da cor do indicador: a calceína muda de verde fluorescente para rosa; o calcon muda de vinho para azul puro e a murexida muda de vermelho para violeta intenso. Titular 3 ou mais alíquotas e, a partir da média dos volumes, calcular o título da solução de EDTA, ou o número de mg de cálcio correspondente a 1 ml de solução do EDTA; calcular o número de mg de magnésio por ml de solução de EDTA a partir de:

$$\text{mg Ca/ml} \cdot 0,6064 = \text{mgMg/ml}.$$

OBS: A solução de EDTA pode ser preparada diretamente como padrão, desde que apresente elevado grau de pureza. Pesar 3,7225 g do sal dissódico di-hidratado do ácido etilenodiaminotetracético (previamente seco a 70-80°C, por 2 horas), transferir para balão de 1 litro e completar o volume com água destilada.

Procedimento:

- a) Transferir 1,0000 g a 2,5000 g da amostra para copo de 250 ml, adicionar 10 a 30 ml de HNO₃ e 5 a 10 ml de HCl, cobrir com vidro de relógio e ferver durante 30 minutos. Se a amostra contiver matéria orgânica, esfriar, adicionar 5 ml de HClO₄ a 70%, aquecer até o desprendimento abundante de vapores de ácido perclórico, sem deixar secar (CUIDADO) e esfriar.
- b) Adicionar 70-80 ml de água destilada, filtrar, se necessário, para balão de 250 ml, através de papel S&S 589, faixa branca ou equivalente.
- c) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume e agitar.
- d) Transferir 100 a 125 ml da solução para um copo de 400 ml.
- e) Ajustar o pH da solução a 4,0, com solução de KOH a 20%, utilizando um potenciômetro e agitador mecânico, para homogeneizar a solução. Se o pH passar de 4,0 corrigir com HCl 1 + 4.
- f) Adicionar um volume variável de solução de sulfato duplo de ferro III e amônio, FeNH₄(SO₄)₂, de acordo com o teor de P₂O₅ do fertilizante (5 ml para fertilizantes com menos de 7% de P₂O₅, 10 ml para fertilizantes com 7 a 15% de P₂O₅ e 15 ml para fertilizante com 16 a 30% de P₂O₅).
- g) Ajustar o pH da solução a 5,0, com solução de KOH a 10% ou com solução de HCl, (1 + 4) se o pH for maior do que 5,0, utilizando potenciômetro e agitador mecânico.
- h) Esfriar, transferir a suspensão do copo para um balão volumétrico de 250ml, lavar o copo com várias porções de água destilada, passando o líquido para o balão, completa; o volume, agitar e deixar em repouso para o precipitado sedimentar.
- i) Filtrar o líquido sobrenadante do balão, com cuidado para evitar que o precipitado entre em suspensão, através do papel pregueado S&S 589, faixa branca ou equivalente, até obter 100 a 120 ml de filtrado, o qual servirá também para a determinação do magnésio.
- j) Transferir 25 a 50 ml do filtrado para um frasco de erlenmeyer de 300 ml e adicionar 100 ml de água destilada.
- k) Adicionar 10 ml de solução de hidróxido de potássio - cianeto de potássio (KOH-KCN), 2 gotas de solução de trietanolamina, 5 gotas de solução de ferrocianeto de potássio, K₄ Fe(CN)₆, 15+ - 1 mg do indicador calceína, ou 6 gotas de solução do indicador calcon ou 0,2 g-0,4 g do indicador murexida.
- l) Colocar o frasco sobre um fundo branco e de preferência usar um agitador magnético em frente à luz fluorescente. Titular imediatamente com a solução padronizada de EDTA a 0,4%, agitando continuamente até a mudança permanente da cor do indicador: a calceína muda de verde fluorescente para rosa; o calcon muda de vinho para azul puro, e a murexida muda do vermelho para violeta intenso. Anotar o volume V₁ da solução de EDTA consumido.
- m) Calcular a percentagem de cálcio mediante a expressão:

$$\%Ca = \frac{V_1 \cdot t_1 \cdot 100}{V_2 \cdot t_2}$$

P₁

sendo:

V₁ = volume (ml) de solução padronizada de EDTA, consumido.

T₁ = título da solução de EDTA expresso em mg de Ca/ml.

P₁ = peso (mg) da amostra contida na alíquota titulada.

C) Método espectrofotométrico de absorção atômica

Reagentes: a) Ácido clorídrico (HCl) p.a.

b) Solução de HCl, 0,5N, 2N e 3N.

c) Ácido perclórico (HClO₄) p.a.

d) Ácido fluorídrico (HF) p.a.

e) Alcool metílico (CH₃ - OH) p.a.

f) Solução de lantânio, a 5%.

Transferir 29,33 g de óxido de lantânio (La₂O₃) para um copo de 400 ml, cobrir com vidro de relógio e adicionar vagarosamente 250 ml de HCl (1 + 1) para dissolver o óxido. Transferir para um balão de 500 ml e completar o volume com água destilada.

g) Solução padrão estoque (A) de cálcio, contendo 500 Mg de Ca/ml. Transferir 1,2486 g de CaCO₃, padrão primário, para copo de 250 ml, cobrir com vidro de relógio, dissolver com 10-20 ml de solução de HCl. 3N, transferir para balão de 1 litro, lavar o vidro de relógio e o copo e completar o volume com água destilada.

h) Solução padrão estoque (B), contendo 25 Mg de Ca/ml. Transferir 25 ml da solução estoque A para um balão de 500 ml e completar o volume com água destilada.

i) Soluções padrões de trabalho contendo 0-5-10-15 e 20 Mg de Ca/ml.

Transferir para balões de 25 ml, 0-5-10-15 e 20 ml da solução estoque B (25 Mg de Ca/ml). Adicionar 5 ml de solução de lantânio a 5% a todos os balões e completar o volume com água destilada.

Essas soluções devem ser usadas recém-preparadas.

Equipamento:

- Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada para cálcio.

Procedimento:

1. Para extração:

1.1 Em materiais inorgânicos, exceto fritas

a) Transferir 1,0000 g da amostra para copo de 150 ml, adicionar 10 ml de HCl concentrado, ferver e evaporar em chapa aquecedora até próximo à secura, sem deixar queimar o resíduo.

b) Dissolver o resíduo com 20 ml de solução HCl 2N, ferver ligeiramente e se necessário, filtrar por papel S&S 589, faixa branca ou equivalente, recebendo o filtrado em um balão de 100 ml. Lavar o copo e o filtrado com 5 porções de 10 ml de água destilada e completar o volume.

c) Se a concentração de cálcio estiver acima do intervalo recomendado para leitura, fazer adequadas diluições com solução de HCl 0,5N. Juntar à última diluição um volume adequado de solução de lantânio, de maneira que a solução final contenha 1 % de lantânio.

d) Preparar uma prova em branco.

1.2 Materiais contendo matéria orgânica

a) Transferir 1,0000 g da amostra para copo de vidro pirex ou equivalente, levar à mufla e queimar a 500°C por 1 hora, proporcionando uma adequada aeração, principalmente, no início.

b) Retirar da mufla, esfriar e prosseguir conforme descrito em:

1.1 item a, a partir de "adicionar 10ml de HCl"

"

1.3 Fritas e misturas que as contenham

a) Transferir de 0,5000 g a 1,0000 g da amostra (moída e passada em peneira nº 100) para cadinho de platina e acrescentar 5 ml de HClO_4 e 5 ml HF.

b) Colocar o cadinho em uma cápsula de porcelana de fundo chato e o conjunto sobre uma chapa aquecedora.

c) Aquecer até o desprendimento de densos vapores brancos de HClO_4 .

d) Retirar da chapa, esfriar, diluir cuidadosamente, com 50 ml de água destilada, transferir para um copo de 100 ml e filtrar por papel S&S 589, faixa branca ou equivalente, recebendo o filtrado num balão de 100 ml. Lavar o copo e o filtrado com 5 porções de 5 ml de água destilada e completar o volume.

e) Se a concentração de cálcio estiver acima do intervalo recomendado para leitura, fazer adequadas diluições com solução de HCl 0,5N. Juntar à última diluição, um volume adequado de solução de lantânio, de maneira que a solução final contenha 1 % de lantânio.

f) Preparar uma prova em branco.

2. Para determinação:

a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do cálcio (lâmpada de cátodo ôco para Ca. comprimento de onda 4227 Å, e chama adequada).

b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.

c) Lavar o queimador com água desmineralizada.

d) Acertar as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.

e) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbância). Se houver conveniência estabelecer a equação de regressão.

g) Determinar a concentração de cálcio na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a porcentagem de cálcio no material analisado.

3.5 Magnésio

A) Método gravimétrico do pirofosfato

Reagentes:

a) Ácido nítrico (HNO_3), p.a.

b) Ácido Clorídrico (HCl), p.a.

c) Solução de bromofenol azul a 0,2%. Preparar conforme descrito em 3.2.6, letra c, do método permanganométrico para cálcio.

d) Amônia, NH_3 p.a.

e) Solução de amônia (1+1), (1+4) e (1+9).

f) Solução saturada de oxalato de amônio.

Preparar conforme descrito em 3.2.6, letra f, do método permanganométrico para cálcio.

g) Solução de ortofosfato diamônico a 20%.

Dissolver 20,0 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ em 100 ml de água destilada.

h) Solução de ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), a 10%,

Dissolver 10 g de ácido cítrico mono-hidratado em 70-80 ml de água destilada e completar o volume a 100 ml.

i) Solução de bromotimol azul a 0,2%.

Transferir 0,10 g de bromotimol azul para um gral de porcelana pequeno, adicionar 3,20 ml de solução de NaOH 0,05N, aos poucos (porções de 0,20-0,30 ml), homogeneizando até dissolver o material sólido. Transferir para um balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com água destilada e agitar.

Procedimento:

a) Transferir 1,0000 g a 2,5000 g de amostra para um copo de 250 ml, adicionar 10 a 30 ml de HNO_3 e 5 a 10 de HCl, cobrir com vidro de relógio e ferver durante 30 minutos.

b) Adicionar 70-80 ml de água destilada, filtrar, se necessário, para balão de 250 ml, através de papel S&S 589 faixa branca ou equivalente.

c) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume e agitar,

d) Transferir uma alíquota de 25 ml a 50 ml de solução para um copo de 250 ml ou 400 ml, adicionar 70-80 ml de água destilada e homogeneizar.

e) Adicionar 4 gotas da solução de bromofenol azul a 0,2%, solução de amônia (1 + 4), aos poucos, até o indicador passar da cor amarela a verde (pH 3,5 a 4,0) e adicionar mais 40-50 ml de água destilada.

OBS.: Pode ser usado o indicador vermelho de metila ou solução alcóolica a 0,2% (0,2 g do indicador em 100 ml de álcool etílico) e a mudança de cor deverá ser de vermelho para rosa (pH 3,5-4,0).

f) Aquecer até quase atingir a ebulição e adicionar aos poucos, 30 ml de solução saturada de oxalato de amônio a 85-90°C, agitando continuamente.

g) Manter o pH da solução indicado pela cor verde do indicador (ou cor rósea, se o indicador for vermelho de metila) através do emprego da solução de NH_3 (1 + 4) ou de HCl (1 + 4).

h) Deixar em banho-maria durante 1 hora e esfriar, mantendo sempre o pH indicado.

i) Filtrar através do papel S&S 589, faixa branca ou equivalente ou de cadinho com fundo de vidro sinterizado de poros idade média, para um frasco de erlenmeyer de 300 ml ou para um frasco de filtração a vácuo, de 300ml.

j) Lavar o precipitado com 10 porções de água quente (70-80°C), de 10 ml cada uma.

k) Transferir para um copo de 400 ml, o filtrado obtido da separação do oxalato de cálcio.

l) Adicionar 10 ml de solução de ácido cítrico a 10%, 4 gotas da solução de bromotimol azul, NH_3 (1 + 1) até a viragem do indicador (a solução deverá ficar azul) e 10 ml de solução de ortofosfato diamônico, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, a 20%.

m) Agitar vigorosamente a solução com o auxílio de um bastonete de vidro sem encostar ou atritar as paredes do copo, até a formação de precipitado.

n) Adicionar 15 ml de NH_3 deixar em repouso 2 horas, agitando 2 a 3 vezes na primeira hora (quando a quantidade de precipitado for muito pequena ou quando não se percebe a sua formação, deixarem repouso durante a noite).

o) Filtrar através de papel S&S 589, faixa azul ou equivalente, adaptado a um funil de haste longa, para um frasco de erlenmeyer de 500 ml ou copo de 600 ml.

p) Lavar o copo onde foi feita a precipitação, o papel de filtro e o precipitado com 10 porções de 10 ml cada uma de solução de NH_3 (1 + 9).

q) Transferir o papel de filtro contendo o precipitado para um cadinho de porcelana, previamente tarado, colocar o cadinho na entrada do forno mufla a 850.900°C e deixar até queimar o papel.

Transferir o cadinho para o centro do forno e deixar a 900°C durante uma hora.

r) Retirar o cadinho do forno, colocá-lo em dessecador, deixar esfriar e pesar.

s) Calcular o percentual de Mg pela expressão:

$$\%Mg = \frac{P_1 \times 21,84}{P_2}$$

P_1 = peso do precipitado ($Mg_2P_2O_7$), em gramas.

P_2 = peso da amostra, em gramas, contido na alíquota pipetada conforme item d.

8) Método quelatométrico do EDTA (aplicável a amostras com teor de Mn ou Zn = 0,25%)

Reagentes:

a) Solução tampão, pH = 10.

Dissolver 67,5 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em, aproximadamente, 200 ml de água destilada, adicionar 570 ml de amônia (NH_3) e diluir a litro. Testar o pH, diluindo 5 ml da solução tampão a 100 ml com água destilada; corrigir o tampão, se necessário.

b) Solução de cianeto de potássio, KCN, a 2%.

c) Solução aquosa de trietanolamina (1 + 1).

d) Solução do indicador eriocromo preto T em álcool metílico e com hidroxilamina.

Dissolver 200 mg do indicador em 50 ml de álcool metílico contendo 2 g de cloridrato de hidroxilamina ($NH_2OH \cdot HCl$); duração 20-25 dias.

e) Solução de EDTA dissódio a 0,4% padronizada - já descrita no item h dos reagentes do método B, para det. do cálcio.

f) Solução de ferrocianeto de potássio a 4%.

Dissolver 4 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ em 100 ml de água destilada.

Procedimento:

a) Transferir 1,0000 g a 2,5000 g da amostra para copo de 250 ml, adicionar 10 a 30 ml de HNO_3 e 5 a 10 ml HCl, cobrir com vidro de relógio e ferir durante 30 minutos. Se a amostra contiver matéria orgânica, esfriar, adicionar 5 ml de $HClO_4$ a 70%, aquecer até o desprendimento abundante de vapores de ácido perclórico, sem deixar secar (CUIDADO) e esfriar.

b) Adicionar 70-80 ml de água destilada, filtrar, se necessário, para balão de 250 ml, através de papel S&S 589, faixa branca ou equivalente.

c) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume e agitar.

d) Transferir 100 a 125 ml da solução para um copo de 400 ml.

e) Ajustar o pH da solução a 4,0, com solução de KOH a 20%, utilizando um potenciômetro e agitador mecânico, para homogeneizar a solução. Se o pH passar de 4,0 reajustar com HCl (1 + 4).

f) Adicionar um volume variável de solução de sulfato duplo de ferro III e amônio, $FeNH_4(SO_4)_2$, de acordo com o teor de P_2O_5 do fertilizante (5 ml para fertilizantes com menos de 7% de P_2O_5 e 10 ml para fertilizantes com 7 a 15% de P_2O_5 e 15 ml para fertilizantes com 16 a 30% de P_2O_5).

g) Ajustar o pH da solução a 5,0, com solução de KOH a 10% ou com solução de HCl (1 + 4) se o pH for maior do que 0,5, utilizando potenciômetro e agitador mecânico.

h) Esfriar, transferir a suspensão do copo para um balão volumétrico de 250 ml, lavar o copo com várias porções de água destilada, passando o líquido para o balão, completar o volume, agitar e deixar em repouso para o precipitado sedimentar.

i) Filtrar o líquido sobrenadante do balão, com cuidado para evitar que o precipitado entre em suspensão, através de papel plegueado S&S 589, faixa branca ou equivalente, até obter 100 a 120 ml de filtrado, o qual servirá também para a determinação do magnésio.

j) Transferir 25 a 50 ml do filtrado, para um frasco de erlenmeyer de 300 ml e adicionar 100 ml de água destilada- (Procurar pesar alíquota idêntica à utilizada na det. do cálcio, se possível, caso contrário, ajustar por cálculo os valores de V_1 e V_2 , da expressão do item m.

k) Adicionar 5 ml de solução tampão (pH = 10), 2 ml de solução de KCN a 2%, 2 gotas de solução de trietanolamina, 5 gotas de solução de ferrocia neto de potássio e 8 gotas de solução do indicador eriocromo preto T, homogeneizando após a adição de cada reagente.

l) Colocar o frasco sobre um fundo branco e de preferência usar um agitador magnético em frente à luz fluorescente.

Titular imediatamente com solução padronizada de EDTA a 0,4% agitando continuamente até que a solução passe a dar cor de vinho para azul puro; anotar o volume V_2 .

m) Calcular a percentagem de Mg, usando a expressão:

$$\%Mg = \frac{(V_2 - V_1) t_2 \times 100}{P_2}$$

V_2 = volume (ml) de solução padronizada de EDTA consumido nesta titulação.

V_1 = volume (ml) de solução padronizada de EDTA consumido na determinação do cálcio (item 1 do procedimento do Método B, para det. do cálcio).

t_2 = título da solução de EDTA, expresso em mg de Mg por ml, calculado conforme item h dos reagentes do Método B para det. do cálcio.

P_2 = peso, em mg, da amostra, contido na alíquota titulada.

C) Método espectrofotométrico de absorção atômica

Reagentes:

a) Solução padrão estoque (A) de magnésio, contendo 250 microgramas de Mg^{2+} /ml. Transferir 250,0 mg de magnésio metálico para um copo de 250 ml, cobrir com vidro de relógio, adicionar 10 ml de água destilada, dissolver com 10 ml de solução de HCl_3N (1:4) adicionados aos poucos, transferir para um balão de 1 litro, lavar o copo, o vidro de relógio e completar o volume com água destilada.

b) Solução padrão estoque B, contendo 5 microgramas de Mg^{2+} /ml. Transferir 10 ml de solução estoque para um balão de 500 ml, adicionar 20 ml de solução de HCl 0,5N e completar o volume com água destilada.

c) Soluções padrões de trabalho, de magnésio: Transferir 0-1-2-4-7 e 10 ml da solução estoque B (5 ppm de Mg) para um balão de 25 ml. Adicionar 5 ml de solução de lantânio a 5% a todos os balões e completar o volume com água destilada. As soluções padrões de trabalho contém 0,0-0,2-0,4-0,8-1,4 e 2,0 microgramas de magnésio por ml e devem ser recém-preparadas.

As demais soluções necessárias acham-se descritas no método C, para determinação do cálcio.

Equipamento:

- Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada para Mg.

Procedimento:

1. Para a extração

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do Método C, para extração do cálcio.

2. Para a determinação:

- a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do magnésio (lâmpada de cátodo ôco para Mg, comprimento de onda 2852 Å e chama adequada).
- b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.
- c) Lavar o queimador com água desmineralizada.
- d) Acertar novamente o zero com a prova em branco.
- e) Proceder as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.
- f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbância). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.
- g) Determinar a concentração de magnésio na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de magnésio no material analisado.

3.6 Enxofre total

Reagentes:

a) Solução de bromo a 10% em tetracloreto de carbono. Em capela com tiragem forçada, adicionar 10 g de bromo a 90 g (56,5 ml) de tetracloreto de carbono, contido em copo de 500 ml e homogeneizar. Conservar em frasco de vidro provido de rolha esmerilhada.

OBS.: O bromo é um líquido volátil e seus vapores são muito irritantes aos olhos e aos pulmões, além de provocar queimaduras e bolhas quando em contato com a pele (CUIDADO)

b) Solução de cloreto de bário a 10%.

c) Ácido clorídrico, HCl, p.a.

d) Ácido nítrico, HNO₃ p.a.

Procedimento:

a) Transferir de 1,0000 a 2,5000 g da amostra ou peso contendo de 50 a 150 mg de enxofre (5), para um copo de 250 ml.

b) Adicionar 20 ml da solução de bromo em tetracloreto de carbono, homogeneizar e agitar em intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.

c) Adicionar 15 ml de HNO₃, misturar conforme foi descrito na letra b e evaporar em banho-maria em capela com tiragem forçada, até reduzir o volume a 1-2 ml.

d) Adicionar 15 ml de HCl, 10 ml de água destilada e evaporar até secar, em chapa aquecedora ou em banho-maria.

e) Adicionar 10 ml de HCl, 50 ml de água destilada, ferver durante 5 minutos e filtrar através de papel de filtro (5&5 589, faixa azul, ou Whatman n° 42, ou equivalente) para copo de 400 ml.

f) Lavar o papel com 20 porções de 10 ml cada uma de água destilada a 85-90°C.

g) Aquecer o filtrado à ebulição, adicionar 5-6 gotas de solução de cloreto de bário a 10% e, após 1 minuto, acrescentar, gota a gota, mais 10 ml da solução de cloreto de bário (ou acrescentar um volume de solução de acordo com o teor de enxofre esperado e mais 5 ml, levando em conta que 1 ml corresponde a 14 mg de 5).

h) Cobrir com vidro de relógio, deixar digerir em banho-maria em ebulição durante 1 hora, remover e deixar sedimentar durante 15-20 minutos.

i) Filtrar imediatamente, usando sucção, através de um cadinho de Gooch preparado com amianto, previamente queimado a 500°C e tarado. Essa filtração também pode ser feita através de papel de filtro 5&5 589, faixa azul ou equivalente.

- j) Lavar com 10 porções de 10 ml, cada uma, de água destilada a 80-90°C e continuar a lavagem caso o teste de cloreto executado no filtrado, com 3 ml de solução de AgNO₃ a 1%, seja positivo, até o filtrado não acusar a presença de cloreto.
- k) Transferir o cadinho para uma estufa a 110-115°C, colocando-o sobre uma cápsula de porcelana limpa e deixar secar. Caso a filtração tenha sido feita em papel, este e o precipitado devem ser colocados num cadinho de porcelana tarado e levado à estufa.
- l) Transferir o cadinho seco para um forno, elevando a temperatura até 800°C, mantendo a porta entreaberta durante a elevação da temperatura, fechar a porta do forno e conservá-lo nessa temperatura durante 1 hora.
- m) Retirar o cadinho, colocar em dessecador para esfriar e pesar.
- n) Calcular a percentagem de enxofre total mediante a expressão:

$$\%S = \frac{P_1 \times 13,74}{P_2}$$

P₁ = peso do precipitado de BaSO₄, em gramas.

P₂ = peso da amostra, em gramas.

3.7 Boro

Reagentes:

- a) Solução padrão de ácido bórico, contendo 0,1748 mg de B por ml Dissolver 1,0000 g de H₃BO₃, p.a. em água destilada, transferir para balão de 1 litro e completar o volume.
- b) Solução de NaOH, aproximadamente, 10 N ou a 40%. Dissolver 40 g de NaOH em 70-80 ml de água destilada, esfriar, - transferir para balão de 100 ml e completar o volume. Transferir para frasco de plástico e deixar em repouso por aproximadamente 10 dias, ou filtrar através de filtro de vidro sinterizado, de tal maneira que o filtrado seja protegido do CO₂ do ar (tubo contendo cal sodada).
- c) Solução de NaOH, aproximadamente, 0,025 N, livre de CO₂. Ferver 2 litros de água destilada por 20 minutos para remover o CO₂, transferir para um recipiente que permita a entrada de ar livre de CO₂ e que esteja ligado a uma bureta, deixar esfriar, juntar 5 ml do sobrenadante ou filtrado da solução aproximadamente, 10 N de NaOH (livre de Na₂CO₃). HOMOGENEIZAR.

Padronização:

- Pipetar 25 ml da solução padrão de H₃BO₃ para um copo de 250 ml, adicionar 3,0 g de NaCl e 3-4 gotas de solução de vermelho de metila a 0,1%.
- Adicionar solução de HCl 0,5 N, gota a gota e com agitação, até obter a cor amarela do indicador, diluir à aproximadamente 150 ml com água destilada e ferver por 2-3 minutos para eliminar CO₂.
- Esfriar à temperatura ambiente e prosseguir, daqui por diante, a partir do item g do procedimento para a determinação, adiante descrito.
- Desenvolver uma prova em branco, substituindo os 25 ml de solução padrão de H₃BO₃ por água destilada.
- Quantidade de boro equivalente a 1 ml da solução de NaOH (fator A) é:

$$\text{mg B/ml NaOH} = A = \frac{4,369}{V_1 - V_2}$$

- d) Solução de NaOH, aproximadamente, 0,5 N, livre de CO₂. Proceder de maneira idêntica ao preparo da solução de NaOH 0,025 N livre de CO₂ já descrito; ferver

apenas 500 ml de água destilada e juntar 25 ml do sobrenadante ou filtrado da solução a 40% de NaOH.

e) Solução de HCl, aproximadamente, 0,5 N. Diluir 4 ml de HCl a 100 ml, com água destilada.

f) Solução de HCl, aproximadamente 0,02 N. Diluir 1,5 ml de HCl em água destilada e completar o volume a 1 litro.

g) Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1 %. Dissolver 0,1 g do indicador em 100 ml de álcool etílico a 90-95%.

h) Cloreto de sódio (NaCl), p.a.

i) D-manitol, p.a. ou D-sorbitol cristalizado, p.a.

j) Solução de nitrato de chumbo - $Pb(NO_3)_2$ - a 10%.

Equipamento:

- Necessita-se dispor de dois conjuntos constituídos cada um de uma bureta diretamente ligada a um reservatório destinado a conter solução de NaOH livre de CO_2 . Proteger os reservatórios e as buretas de forma a reter o CO_2 do ar. Sob uma das buretas colocar um agitador magnético e ao lado desse, um potenciômetro sensível, a 0,05 unidade de pH.

Procedimento:

a) Pesar 1,0000 g da amostra (se essa contiver até 0,45% de B; se o conteúdo de B na amostra for maior, pesar uma quantidade menor) e transferir para um copo de 250 ml.

b) Adicionar 50 ml de água destilada, 3 ml de HCl, ferver à ebulição e conservar quente por 5-10 minutos.

c) Mantendo a solução quente, mas sem ferver, proceder ao seguinte tratamento:

- adicionar solução de $Pb(NO_3)_2$ a 10% usando 1 ml desta solução para cada 1,2% de P_2O_5 da amostra;

- adicionar $NaHCO_3$ sólido, pouco por vez até a suspensão aproximar-se da neutralização, o que é reconhecido pela formação de um precipitado branco junto ao material insolúvel presente;

- adicionar 3-4 gotas de solução de vermelho de metila e continuar a adição de $NaHCO_3$, pouco por vez, até a suspensão adquirir a cor amarela ou alaranjada do indicador;

- manter a solução quente, mas não fervendo, por 30 minutos (usar banho de água ou de vapor) adicionando pequenas quantidades de $NaHCO_3$, se necessário, para manter a mesma cor do indicador; se a cor do indicador clarear pela presença de nitrato, adicionar mais indicador e, se necessário, utilizar um teste externo de gotas para acompanhar a neutralização; após a neutralização e o aquecimento, devem restar 40-50 ml de solução.

d) Filtrar através de papel S&S 589, faixa branca ou equivalente, para um copo de 250 ml, lavar o copo e o precipitado com 5 porções de 10 ml de água destilada quente.

e) Acidificar o filtrado com HCl, gota a gota, até obter a cor amarelado indicador e ferver por 2-3 minutos para eliminar CO_2

f) Neutralizar a solução quente com solução de NaOH 0,5 N, reacidificar com "Solução de HCl 0,5 N e acrescentar 0,3-0,5 ml em excesso; diluir a aproximadamente 150 ml, ferver novamente por 2-3 minutos para eliminar o CO_2 remanescente e esfriar à temperatura ambiente em água corrente.

g) Neutralizar grosseiramente com solução de NaOH 0,5 N, livre de CO_2 , levar o copo para o conjunto de titulação, mergulhando os eletrodos e o agitador. Ligar o agitador e ajustar o pH da solução a exatamente 6,30 pela adição de solução de NaOH 0,025 N livre de CO_2 ou HCl 0,02 N, conforme o caso (quando adequadamente ajustado, o pH

deve ser invariável; flutuações são freqüentemente devidas a incompleta remoção do CO₂.

h) Encher a bureta com solução padronizada de NaOH - 0,025 N, livre de CO₂, adicionar 20 g de manitol, ou D-sorbitol cristalizado, à solução do copo e titular com a solução de NaOH 0,025 N, livre de CO₂, até o pH da solução voltar a exatamente 6,30. Anotar o volume gasto (V₁).

i) Desenvolver uma prova em branco e anotar o volume de solução de NaOH 0,025 N gasto (V₂).

j) Calcular a percentagem de boro na amostra pela expressão:

$$\%B = \frac{(V_1 - V_2) A}{10 \times \text{peso da amostra (g)}}$$

A = mg de boro (B) equivalente a 1 ml de solução de NaOH 0,025 N, calculado conforme padronização letra c.

V₁ = volume (ml) da solução padronizada de NaOH gasto na titulação da amostra.

V₂ = volume (ml) da solução padronizada de NaOH gasto na titulação da prova em branco.

3.8 Zinco

A - Método Gravimétrico

(Aplicável em amostras contendo 0,1% ou mais de Zn).

Reagentes:

a) Ácido nítrico, HNO₃ p.a.

b) Ácido sulfúrico, H₂SO₄, p.a.

c) Gás Sulfídrico, H₂S. Obtido no aparelho de Kipp, através da reação do sulfeto ferroso (FeS), com solução de HCl (1 + 1) ou H₂SO₄ (1 t 1), (CUIDADO, VENENO). usar sempre dentro de capela.

d) Solução de H₂SO₄ a 1%, saturada de H₂S.

Diluir 10 ml de solução de H₂SO₄ concentrado, a 1 litro com água destilada. Saturar esta solução com H₂S, borbulhando o referido gás durante 10 minutos.

e) Solução saturada de KMnO₄. Pesar 70 g de KMnO₄ e transferir para um frasco de vidro escuro e acrescentar 1 litro de água destilada. Agitar muito bem.

f) Solução de ácido cítrico a 40%. Dissolver 40 g do ácido monohidratado em água destilada. Transferir para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume.

g) Solução de bromofenol azul a 0,04%. Transferir 0,1 g do indicador para um gral de porcelana pequeno, acrescentar 3 ml de solução 0,05 N de NaOH e triturar até completa dissolução. Transferir para balão volumétrico de 250 ml e completar o volume com água destilada.

h) Solução de amônia, NH₃, p.a.

i) Solução de amônia NH₃ (1+1).

j) Solução de ácido sulfúrico, H₂SO₄, (1 + 1).

k) Solução de ácido cítrico a 0,05% de pH = 3,0. Dissolver 0,5 g de ácido monohidratado em água destilada e completar o volume a 1 litro de água destilada. Acertar o pH dessa solução a 3,0 com solução de HCl ou de NH₃.

l) Solução de ácido cítrico a 0,05%, saturada de H₂S.

Dissolver 0,5 g de ácido monohidratado, em água destilada e completar o volume a 1 litro. Saturar essa solução com H₂S borbulhando o referido gás durante 10 minutos.

m) Solução de SO₂ a 6%. Borbulhar SO₂ em 1 litro de água destilada, durante 15 minutos. O gás (SO₂) é obtido fazendo reagir solução de H₂SO₄ a 20% com solução de

Na₂SO₃ a 37%. A reação pode ser feita num Kitassato contendo 100 ml de solução de Na₂SO₃ sobre a qual goteja-se a solução de H₂SO₄ através de um funil de separação.

Procedimento:

- a) Pesar 10,0000 g da amostra, se esta contiver menos de 0,2% de Zn ou pesar 2,000 g se a amostra contiver mais de 0,2% de Zn, transferir para erlenmeyer de 250-300 ml e adicionar 5.10 ml de solução de H NO₃ concentrado e 7 ml de solução de H₂SO₄ concentrado. Digerir em chapa elétrica até o aparecimento de densos fumos brancos. Se a solução escurecer devido à presença de matéria orgânica, esfriar, adicionar mais 1-2 ml de solução de HNO₃ concentrado e digerir novamente até o aparecimento de densos fumos brancos. Repetir, se necessário, até a completa destruição da matéria orgânica.
- b) Esfriar, adicionar 25-30 ml de água destilada, ferver por 1 minuto Retirar do fogo e deixar em repouso por 15 minutos, agitando ocasionalmente.
- c) Filtrar por papel S &S 589, faixa branca, recebendo e filtrando num erlenmeyer de 250.300 ml. Lavar o frasco, contendo o resíduo e filtro, com 6 porções de 5 ml de água destilada quente. Esfriar à temperatura ambiente e diluir aproximadamente 100 ml.
- d) Passar H₂S através da solução durante 10-15 minutos.
- e) Filtrar através de papel S&S 589 faixa azul, recebendo o filtrado em outro erlenmeyer de 250-300 ml. Lavar o erlenmeyer que continha o precipitado e o filtro com sete porções de 5 ml de solução de H₂ SO₄ a 1 %, saturada de H₂S.
- f) Evaporar o filtrado até obter um volume de aproximadamente 100 ml. Se a solução estiver mais escura que amarelo claro ou verde claro, adicionar , na solução em ebulição, solução saturada de KMnO₄' gota a gota, até manter um pequeno excesso de KMnO₄ (solução rósea).
- g) Adicionar solução de SO₄ a 6% até o manganês ser reduzido (desaparecimento da cor rósea), adicionar 1-2 ml de excesso e continuar a evaporação até aproximadamente 80 ml.
- h) Esfriar, adicionar 5 ml de solução de ácido cítrico a 40% e 2 gotas de solução de bromofenol azul.
- i) Adicionar solução de amônia (NH₃) até o indicador mudar para cor amarela. Ajustar o pH da solução a 3,0 adicionando solução de amônia (NH₃) (1+1) ou de H₂SO₄ (1+1), gota a gota. Isso é feito por comparação, colocando 100 ml da solução de ácido cítrico a 0,05% de pH = 3,0 em outro erlenmeyer de 250 ml e duas gotas do indicador bromofenol azul.
- j) Passar H₂S na solução durante 35 minutos, por borbulhamento rápido. Filtrar por papel S&S 589, faixa azul. Transferir todo o precipitado para o filtro, empregando jato de solução de lavagem. Lavar o precipitado contido no filtro, com 7 ou mais porções de 5 ml da solução de lavagem, conservando tanto quanto possível, o funil coberto com vidro de relógio.
- k) Transferir o papel de filtro contendo o precipitado para um cadinho de palatina previamente queimado e tarado, com a respectiva tampa. Levar o cadinho descoberto ao forno, aquecer a 300-350°C até o papel ser oxidado e depois elevar a temperatura a 950-1000°C por hora. Retirar o cadinho do forno, transferir para dessecador contendo H₂SO₄, cobrir o cadinho com a tampa, esperar esfriar e pesar o resíduo (ZnO).
- l) Calcular a percentagem de zinco (Zn) pela expressão:

$$\% \text{ Zn} = \frac{80,34 \times P_2}{P_1}$$

P₁ = peso da amostra, em gramas, na alíquota analisada.

P₂ = peso do resíduo (ZnO) em gramas.

B) Método espectrofotométrico de absorção atômica

Reagentes:

- a) Solução estoque A, contendo 250 microgramas de Zn^{2+} /ml. Transferir 250,0 mg de zinco metálico para copo de 250 ml, cobrir com vidro de relógio, dissolver com 10 ml de solução de HCl 6 N, transferir para balão volumétrico de 1 litro, lavando o copo com 5 porções de 10 ml de HCl 0,5 N e completar o volume com água desmineralizada.
 - b) Solução estoque A, contendo 50 microgramas de Zn^{2+} /ml. Transferir 20 ml da solução estoque A para balão de 100 ml e completar o volume com solução de HCl 0,5 N. Homogeneizar .
 - c) Soluções padrões de zinco. Transferir 0,0-1,0-2,0-4,0-6,0-8,0 e 10,0 ml da solução estoque B (50 ppm de Zn^{2+}) para balões de 100 ml e completar o volume com solução de HCl 0,5 N. Essas soluções contêm, respectivamente, 0,0-0,5-1,0-2,0- 3,0-4,0 e 5,0 microgramas de zinco por ml e devem ser recém-preparadas.
- As demais soluções ,necessárias acham-se descritas no método C, para determinação do cálcio.

Equipamento:

-Espectrofotômetro de absorção atômica. equipado com lâmpada para zinco.

Procedimento:

1. Para extração:

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C. para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

2. Para a determinação:

- a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do zinco (lâmpada de cátodo ôco para zinco, comprimento de onda 2 1 3 8 Å e chama adequada).
- b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.
- c) Lavar o queima dor aspirando água desmineralizada.
- d) Acertar novamente o zero com a prova em branco.
- e) Proceder às leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.
- f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras.(absorbância). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.
- g) Determinar a concentração de zinco na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir. a percentagem de zinco no material analisado.

3.9 Cobre

A- Método volumétrico

Reagentes:

- a) Ácido nítrico (HNO_3) p.a.
- h) Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.
- c) Solução concentrada de hidróxido de amônio (NH_4OH) p.a.
- d) Bifluoreto de amônio (NH_4HF_2) p.a.
- e) Iodeto de potássio (KI) p.a.

- f) Solução de HCl, aproximadamente, 1 N.
g) Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) padrão primário.
h) Solução verde do bromocresol a 0,1 %.

Transferir 0,1 g do indicador para gral de ágata, acrescentar 1,5 ml de solução de NaOH 0,1 N e triturar até dissolver. Transferir para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com água destilada.

- i) Solução de amido a 1%.

Transferir 1 g de amido p.a. para um copo. Adicionar água suficiente para fazer uma pasta, adicionar 100 ml de água fervendo e ferver por 1 minuto, com agitação.

- j) Solução padronizada de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), aproximadamente, 0,1 N. Dissolver 25 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ em 1 litro de água destilada. Ferver por 5 minutos e transferir enquanto quente para um frasco escuro previamente limpo, com solução sulfocrômica quente e lavado com água fervida. Esperar esfriar e padronizá-la da seguinte maneira: transferir 0,2000 g $K_2Cr_2O_7$ (padrão primário), seco por 2 horas a $100^\circ C$, para frasco de erlenmeyer de 250-300 ml, acrescentar, aproximadamente, 80 ml de água destilada e agitar até a completa dissolução; acrescentar 2 g de KI, agitar até dissolver; adicionar 20 ml de solução 1 N de HCl e, imediatamente, colocar o frasco num lugar escuro por 10 minutos. Titular com a solução de $Na_2 S_2O_3$ 0,1 N até a solução do erlenmeyer adquirir cor amarela clara; interromper a titulação; adicionar 1 ml da solução de: amido, prosseguir até o desaparecimento da cor azul e anotar o volume gasto. Calcular a normalidade da solução pela expressão:

$$N = \frac{200}{(\text{ml } Na_2S_2O_3 \times 49,03)}$$

- k) Solução padronizada de $Na_2S_2O_3$, -0,03 N. Preparar por diluição da solução padronizada, 0,1 N, no momento do uso.

Procedimento:

- a) Transferir 2,0000 g da amostra preparada para frasco de erlenmeyer de 250-300 ml e adicionar 10 ml de HNO_3 e 5 ml de H_2SO_4 .
b) Aquecer em chapa aquecedora até o aparecimento de fumos brancos (se a solução escurecer devido à matéria orgânica, esfriar ligeiramente, adicionar mais um pouco de solução de HNO_3 e digerir outra vez até o aparecimento de fumos brancos, repetindo a operação se necessário até a matéria orgânica ser completamente destruída), esfriar, adicionar 50 ml de água destilada, ferver por 1 minuto e esfriar à temperatura ambiente.
c) Adicionar 3 gotas da solução de verde de bromocresol e amônia até o indicador mudar para cor verde clara ($pH = 4,0$).
d) Esfriar outra vez à temperatura ambiente e se o indicador mudar para a cor amarela, adicionar amônia (1 +3) gota a gota, até o indicador voltar a verde claro. Evitar excesso de amônia.
e) Adicionar 2 g de NH_4HF_2 (CUIDADO, TÓXICO), agitar até dissolver e deixar em repouso por 5 minutos.
f) Adicionar 8-10 g de KI, agitar até dissolver e titular com a solução padronizada de $Na_2S_2O_3$ 0,03 N até a solução adquirir uma cor amarela clara; interromper a titulação, adicionar 1 ml de solução de amido e prosseguir a titulação até o desaparecimento da cor azul, que não deverá voltar dentro de 20 segundos de repouso. Anotar o volume gasto (V) em ml,
g) Calcular a percentagem de cobre na amostra, pela expressão:
 $\% Cu = V \times 0,095$

B) Método espectrofotométrico de absorção atômica

Reagentes:

a) Cobre metálico puro (eletrolítico).

b) Solução estoque contendo 200 microgramas de cobre/ml. Transferir 200,0 mg de cobre metálico puro para copo de 250 ml, cobrir com vidro de relógio, acrescentar 2.3 gotas de HNO_3 e 5-6 ml de solução de HCl (1 + 1). Ferver até quase secar, diluir com solução de HCl -0,1 N, transferir para balão de 1 litro e completar o volume com o mesmo ácido.

c) Soluções padrões de trabalho, de cobre. Transferir 0,0-1,0-2,5- 7.5-10,0 ml da solução que contém 200 microgramas de Cu^{2+} por ml para balões de 100 ml e completar o volume com solução de HCl 0,5 N. As soluções padrões contêm, respectivamente 0,0-2- 5-10 e 20 microgramas de Cu^{2+} por ml e devem ser recém-preparadas.

As demais soluções necessárias acham-se descritas no método C, para determinação do cálcio.

Equipamento:

-Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada para cobre.

Procedimento:

1. Para extração:

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C, para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

2. Para a determinação:

a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do cobre (lâmpada de cátodo ôco para cobre, comprimento de onda 3 2 4 7 Å e chama adequada).

b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.

c) Lavar o queimador com água desmineralizada.

d) Acertar novamente o zero com a prova em branco.

e) Proceder às leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.

f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbâncias). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.

g) Determinar a concentração de cobre na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de cobre no material analisado.

3.10 Manganês

A) Método colorimétrico

Reagentes:

a) Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.

b) Ácido nítrico (HNO_3) p.a.

c) Ácido fosfórico (H_3PO_4) p.a.

d) Oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) padrão primário.

e) Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (5 + 95).

f) Solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) (1 + 9)

g) Periodato de potássio (KIO_4) p.a.

h) Solução estoque A de manganês, contendo aproximadamente, 550 microgramas de Mn por ml.

Dissolver 1,60 g de permanganato de potássio em 1 litro de água destilada, ferver durante 1 hora, cobrir com vidro de relógio e deixar em repouso durante 12 a 18 horas, filtrar com sucção através de funil provido de placa filtrante de vidro sinterizado, (1d4 ou equivalente) recebendo o filtrado em recipiente de vidro escuro (funil e os frascos devem ser lavados previamente com solução sulfocrômica, quente). Padronizar essa solução com oxalato de sódio, padrão primário, e calcular a concentração de manganês em microgramas de Mn por ml em ppm. de Mn através da expressão:

$\text{ppm Mn} = 10988 \times N$ (normalidade exata da solução de KMnO_4).

i) Solução estoque B contendo 50 ppm de Mn.

Transferir uma alíquota da solução estoque A, que contenha 25 mg de Mn, para copo de 400 ml Adicionar 100 ml de água destilada, 15 ml de H_3PO_4 , 0,3 g de KIO_4 e aquecer à ebulição.

j) Solução de manganês.

Transferir 0-2-4-8-12-16 e 20 ml de solução estoque B para balões volumétricos de 50 ml e completar o volume com água destilada previamente fervida com 0,3 g de (KIO_4) por litro. Tais soluções contém 00-2-4-8-12-16 e 20 microgramas de Mn por ml, respectivamente.

Equipamento:

- Colorímetro ou espectrofotômetro.

- Preparo da curva padrão.

a) Transferir para tubos de colorímetro ou cubetas de espectrofotômetro, um volume adequado de cada solução padrão, de acordo com as dimensões do tubo ou cubetas e com as características do aparelho.

d) Determinar a absorvância de cada solução em colorímetro ou em espectrofotômetro a 530 nanômetros, usando como referência a prova em branco.

c) Estabelecer a curva padrão e/ou a equação de regressão relacionando os valores da absorvância com os respectivos valores da concentração das soluções padrões.

Procedimento:

1. Para extração:

a) Transferir 1,0000 g da amostra para copo de 250 ml, acrescentar 10 ml de H_2SO_4 e 30 ml HNO_3 .

b) Aquecer brandamente até diminuir a evolução de vapores pardos e, em seguida, ferver por 30 minutos. Se a matéria orgânica não estiver totalmente destruída, esfriar, adicionar mais 5 ml de solução de HNO_3 e ferver. Repetir o processo até a completa destruição da matéria orgânica e, finalmente, ferver até o aparecimento de fumos brancos.

c) Esfriar, adicionar 50 ml de solução de H_3PO_4 (1 + 9), ferver alguns minutos e esfriar.

d) Transferir a suspensão para um balão volumétrico de 250 ml, completar o volume. Homogeneizar. Filtrar em papel de filtro (S&S 589, faixa branca ou equivalente), desprezando os primeiros 20-30 ml.

e) Preparar uma prova em branco.

2. Para determinação:

- a) Transferir 50 ml de filtrado para um copo de 250 ml, aquecer até quase fervura e, com agitação da solução, adicionar 0,3 g de KIO_4 . Manter a temperatura entre 90-100°C, por 30-60 minutos. Esfriar, transferir para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume.
- b) Transferir 10 ml da solução para outro balão de 100 ml, - completar o volume e determinar a absorvância em colorímetro ou em espectrofotômetro a 530 nanômetros, tendo como referência a prova em branco preparada de acordo com o ataque do material.
- c) Calcular o número de microgramas de manganês na alíquota do extrato, a partir da curva padrão ou da equação de regressão, calcular a percentagem de manganês no material.

B) Método espectrofotométrico de absorção atômica

Reagentes:

- a) Dióxido de manganês, (MnO_2) p.a.
- b) Solução estoque contendo 200 microgramas de manganês/ml. Transferir 316,5 mg de dióxido de manganês, seco, para um copo de 250 ml, cobrir com vidro de relógio, dissolver com 20 ml de solução de HCl 6 N, ferver durante 2 minutos remover o cloro formado, transferir para balão de 1 litro, completar o volume com solução de HCl 0,5 N. Homogeneizar.

c) Soluções-padrões de manganês.

Transferir 0,0-1,0-2,5-5,0-7,5 e 10,0 ml de solução que contém 200 microgramas de Mn^{2+} por ml para balões de 100 ml e completar o volume com solução de HCl 0,5 N. As soluções-padrão, assim preparadas, contém, respectivamente, 0,0-2-5-10-15 e 20 microgramas de Mn^{2+} por ml e devem ser recém-preparadas.

As demais soluções necessárias acham-se descritas no método C, para determinação do cálcio.

Equipamento:

- Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada para manganês.

Procedimento:

1. Para extração:

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C, para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

2. Para determinação:

- a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do manganês (lâmpada de cátodo ôco para manganês, comprimento de onda 2795 Å e chama adequada).
- b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.
- c) Lavar o queimador com água desmineralizada.
- d) Acertar novamente o zero com prova em branco.
- e) Proceder as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.
- f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbâncias). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.

g) Determinar a concentração de manganês na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de manganês no material analisado.

3.11 Ferro

A) Método volumétrico

Reagentes:

a) Ácido nítrico (HNO_3) p.a.

b) Ácido perclórico (HClO_4) p.a.

c) Ácido clorídrico (HCl) p.a.

d) Solução de difenilamina a 1 %. Dissolver 1 g de difenilamina em 100 ml de H_2SO_4 .

e) Solução de difenilaminassulfonato de sódio a 0,5%.

Dissolver 0,5 g do sal em 70-80 ml de água destilada, transferir para balão de 100 ml e completar o volume com água destilada.

f) Solução de dicromato de potássio 0,100 N.

Transferir 4,9032 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, seco a 100°C durante 2 horas, para balão volumétrico de 1 litro. Dissolver e completar o volume com água. Homogeneizar.

g) Soluções de dicromato de potássio 0,050 N e 0,010 N. Preparar a partir da diluição da solução 0,100 N.

h) Solução saturada de cloreto de mercúrio II. Dissolver 7 g de Hg_2Cl_2 em 500 ml de água destilada e transferir para frasco de vidro com rolha esmerilhada; deixar em repouso durante 12 a 18 horas.

i) Solução de cloreto de estanho II a 20%.

Transferir 20 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para um copo seco de 250 ml, adicionar 20 ml de HCl e aquecer suavemente (pode-se utilizar banho-maria). Transferir para balão de 100 ml e completar o volume com solução de HCl (1 + 2).

j) Solução de ácido fosfórico (1+1).

Procedimento

1. Para extração:

1.1 Fertilizantes sem matéria orgânica.

a) Transferir 1,0000 g da amostra para copo de 250 ml, adicionar 20 ml de solução de HCl (1+1), cobrir com vidro de relógio e ferver com cuidado durante 10 minutos.

b) Adicionar 40-50 ml de água destilada, ferver durante 3-5 minutos, esfriar e filtrar para balão volumétrico de 250 ml, através de papel de filtro S&S 589, faixa branca ou equivalente.

c) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume. Homogeneizar.

1.2 Fertilizantes contendo matéria orgânica.

a) Transferir 1,0000 g de amostra para copo de 250 ml, cobrindo com vidro de relógio ou para frasco de Kjeldahl de 300 ml.

b) Adicionar 25 ml de HNO_3 , ferver durante 30 minutos para oxidar toda a matéria orgânica, retirar da chapa para deixar esfriar.

c) Adicionar 15 ml de HClO_4 , ferver com cuidado até a solução ficar quase incolor, ou até despreendimento de vapores densos de HClO_4 , sem deixar secar, o que poderia provocar explosão (CUIDADO).

d) Adicionar 40-50 ml de água destilada, ferver durante 3-5 minutos, esfriar e filtrar para balão volumétrico de 250 ml, esfriar e filtrar para balão S&S 589, faixa branca ou equivalente.

d) Lavar o copo e o papel com 4 porções de 25 ml de água destilada, esfriar, completar o volume. Homogeneizar.

2. Para determinação:

a) Transferir uma alíquota de 50 a 100 ml do extrato para frasco de erlenmeyer de 300 ml.

b) Aquecer à ebulição, adicionar 3 gotas de solução de difenilaminossulfonato de sódio e solução de cloreto de estanho 11, gota a gota, até descorar a solução, isto é, até desaparecer a cor violeta, e, então, adicionar 2 gotas em excesso de solução de SnCl_2 .

c) Ajustar o volume da solução a 110-120 ml com água destilada, esfriar rapidamente em água corrente e adicionar 10 ml de solução saturada de HgCl_2 (dever-se-á precipitar pequena quantidade de cloreto de mercúrio I).

d) Adicionar 5 ml de solução de H_3PO_4 (1+1), 1 a 2 gotas de solução sulfúrica de difenilamina, e titular com solução $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,050 N (amostras com teor igualou maior de 4% de Fe) ou 0,010 N (amostras com menos de 4% de Fe) até a solução adquirir cor azul, ou verde quando o teor de ferro é baixo.

e) Calcular mediante a expressão:

$$\% \text{ Fe} = \frac{V \times N \times 5,585}{P}$$

onde:

V = volume (ml) da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - gasto na titulação.

N = normalidade da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

P = peso normal (g) da amostra contido na alíquota titulada.

B) Método espectrofotométrico de absorção atômica.

Reagentes:

a) Solução estoque contendo 200 microgramas de ferro/ml.

Transferir 200,0 mg de fio de ferro puro, para copo de 250 ml, adicionar 30 ml de solução de HCl 6 N, cobrir com vidro de relógio e ferver até dissolver. Transferir para balão de 1 litro e completar o volume com solução de HCl 0,5 N.

b) Solução padrão de ferro - transferir 0,0-1,0-2,5-5,0-7,5 e 10,0 ml da solução que contém 200 microgramas de ferro por ml para balões de 100 ml e completar o volume com solução de HCl 0,5 N. Essas soluções contém, respectivamente, 0,0-2-5-10-15 e 20 microgramas de ferro por ml e devem ser recém-preparadas.

As demais soluções necessárias acham-se descritas no método C, para determinação do cálcio.

Equipamento:

- Espectrofotômetro de absorção atômica, equipado com lâmpada para ferro.

Procedimento:

1. Para extração:

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C, para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

2. Para determinação:

a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do ferro (lâmpada de cátodo oco para ferro, comprimento de onda de 2 4 8 Å e chama adequada).

b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.

c) Lavar o queimador com água desmineralizada.

d) Acertar novamente em zero com a prova em branco.

- e) Proceder as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.
- f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbâncias). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.
- g) Determinar a concentração de ferro na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de ferro no material analisado.

3.12 Cloro

Método de Mohr

Reagentes:

a) Solução de cromato de potássio a 5%.

Transferir 5 g de K_2CrO_4 para balão volumétrico de 100 ml. Dissolver com água, completar o volume. Homogeneizar.

b) Solução de cloreto de sódio 0,100 N.

Transferir 5,8443 g de NaCl, seco a 105-110°C por 1 hora para balão volumétrico de 1 litro, dissolver com água destilada, completar o volume Homogeneizar.

c) Solução de nitrato de prata 0,05 N.

Transferir 8,5 g de $AgNO_3$ para balão volumétrico de 1 litro, dissolver com água destilada, completar o volume. Homogeneizar. Conservar em frasco escuro.

Padronização da solução de $AgNO_3$ - Transferir 20 ml de solução de NaCl, para frasco de erlenmeyer de 300 ml, adicionar 60-70 ml de água destilada, 1 ml de solução de K_2CrO_4 a 5% e titular com a solução de $AgNO_3$ até a formação e persistência de um precipitado de coloração parda-avermelhada (Ag_2CrO_4) Calcular a normalidade da solução de $AgNO_3$.

Procedimento:

a) Transferir 2,5000 g da amostra, para um papel de filtro (S&S 589, faixa branca ou equivalente), adaptado em funil e colocar sobre um balão volumétrico de 250 ml.

b) Lavar com 10 porções sucessivas de 15-20 ml de água quente (90-95°C), esfriar, completar o volume e homogeneizar.

c) Transferir de 25 a 50 ml da solução para um frasco de erlenmeyer de 300 ml.

d) Ajustar o volume a 100 ml, aproximadamente, com água destilada e adicionar 1 ml de solução de K_2CrO_4 a 5%.

e) Titular com a solução padronizada de $AgNO_3$ até a formação e persistência de um precipitado de coloração parda-avermelhada. Anotar o volume (V) gasto.

f) Calcular mediante a expressão:

$$\%Cl = \frac{V \times N \times 3,545}{P}$$

onde:

V = volume (ml) da solução $AgNO_3$ gasto na titulação.

N = normalidade da solução de $AgNO_3$.

P = peso (g) da amostra contida na alíquota titulada (item c).

3.13 Molibdênio

A) Método colorimétrico do triocianato de sódio

Reagentes:

- a) Solução padrão estoque (A) de molibdênio (1 mg/ml): Umedecer 1,500 g de óxido de molibdênio (MoO_3), padrão primário, (previamente seco, no mínimo, por 24 horas, em dessecador com H_2SO_4) com pequena quantidade de água destilada, acrescentar cerca de 5 g de NaOH para dissolver completamente, diluir exatamente a um litro com água destilada. Guardar em frasco escuro.
- b) Solução padrão de trabalho de molibdênio (10 ug/ml): Diluir 10 ml da solução padrão estoque A a 1 litro com água destilada. Guardar em frasco escuro.
- c) Mistura HNO_3 - HClO_4 : Adicionar cuidadosamente 200 ml de HClO_4 concentrado à 800 ml de HNO_3 concentrado.
- d) Solução de tiocianato de sódio (NaSCN) a 10%: Dissolver 10 g de tiocianato de sódio (NaSCN) em água destilada e diluir a 100 ml.
- e) Solução de sulfato férrico $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, a 5%: Dissolver 5 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em água destilada, adicionar 10 ml de H_2SO_4 (1 + 1), e diluir a 100 ml com água destilada.
- f) Solução de cloreto de estanho (SnCl_2): Dissolver com aquecimento, 100 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 400 ml de HCl (1 + 1), diluir a 1 litro com água destilada, acrescentar alguns grânulos de estanho, e guardar em frasco escuro.
- g) Solução de ácido clorídrico (HCl), concentrado, p.a.
- h) Solução de ácido nítrico (HNO_3), concentrado, p.a.
- i) Solução de ácido perclórico (HClO_4), concentrado, p.a.

Equipamento:

- Colorímetro ou espectrofotômetro.

Procedimento:

1. Para extração:

1.1 Fertilizantes minerais e fosfatos de rocha

- a) Transferir exatamente 2 a 5 g da amostra para um copo de 250 ml, acrescentar 30 ml de HCl e 10 ml de HNO_3 , cobrir com vidro de relógio e ferver suavemente por 30 minutos em chapa aquecedora.
- b) Remover o vidro de relógio e evaporar em banho-maria até à secura.
- c) Acrescentar pequena quantidade de HCl, - repetir a evaporação à secura, e esfriar.
- d) Acrescentar 40 ml de HCl (1 + 20), aquecer para dissolver os sais, esfriar, diluir exatamente a 250 ml com água destilada, e imediatamente filtrar através de papel de filtro, seco.

1.2 Fertilizantes contendo matéria orgânica.

- a) Transferir exatamente 2-10 g da amostra para copo, acrescentar cerca de 30 ml de HNO_3 cobrir com vidro de relógio e aquecer suavemente (se houver formação de espuma ou reação violenta, deixar esfriar e guardar por uma noite).
- b) Cobrir com vidro de relógio após cessar a reação violenta, evaporar a maioria de ácido até concentrar a solução à xarope.
- c) Lavar internamente o copo e o vidro de relógio com pequena quantidade de água destilada e acrescentar 30-50 ml da mistura de HNO_3 - HClO_4 .
- d) Aquecer novamente sem o vidro de relógio para evaporar a maioria de ácido. Quando fumos brancos de HClO_4 aparecerem, cobrir com vidro de relógio, novamente, e continuar o aquecimento, no mínimo, por 10 minutos. Se a digestão da matéria orgânica não estiver ainda completa, esfriar um pouco, acrescentar pequena quantidade de HNO_3 , e aquecer outra vez para digerir.

e) Esfriar, acrescentar 40 ml de HCl (1+20), aquecer para dissolver os sais, esfriar, diluir exatamente a 250 ml com água destilada, e filtrar imediatamente, através de papel de filtro, seco.

OBS.: No caso de amostras constituídas principalmente de matéria orgânica, proceder como se segue:

Transferir exatamente 10-20 g de amostra para cápsula de porcelana, aquecer em chapa aquecedora para queimar, transferir para forno elétrico e elevar gradativamente a temperatura até atingir cerca de 450°C, permanecendo nessa temperatura por 1 hora. Deixar esfriar e, se o carbono ainda permanecer, acrescentar 5 ml de HNO₃ e aquecer em chapa aquecedora para digerir. Evaporar a maior parte do ácido e deixar esfriar: Acrescentar 40 ml de HCl (1 +20), aquecer para dissolver os sais, esfriar, diluir exatamente a 250 ml com água destilada, e filtrar imediatamente, através de papel de filtro, seco

Preparo da curva padrão

a) Transferir 0-1-5-10-15-20-25 e 30 ml da solução padrão de trabalho de molibdênio (10ug/ml) para balões volumétricos de 100 ml.

b) Acrescentar 5 ml da solução de H₂SO₄ (1+1), 5 ml de solução de HClO₄ concentrado e 2 ml da solução de Fe₂(SO₄)₃.

c) Adicionar lentamente, e sob agitação, 16 ml da solução de NaSCN, 10 ml da solução de SnCl₂ e completar o volume com água destilada.

d) Desenvolver uma prova em branco.

f) Construir a curva padrão e, se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão, relacionando os valores das absorvâncias das soluções com seus respectivos conteúdos de molibdênio.

2. Para determinação

a) Transferir uma alíquota da solução da amostra contendo de 1-300ug de Mo em um frasco volumétrico de 100 ml e prosseguir conforme descrito no preparo da curva padrão, a partir do item b. Se a solução apresentar turbidez após a cor amarela do ferro desaparecer, clarear por centrifugação. A centrifugação deve ser feita após repousar 1 hora, se o CuNCS for a causa da turvação.

b) Desenvolver uma prova em branco.

c) Determinar a absorvância da solução contra a prova em branco. Determinar a quantidade de molibdênio na alíquota analisada, através da curva padrão ou da equação de regressão. Calcular a percentagem de molibdênio no material analisado.

OBS.: Se a absorvância da cor desenvolvida pela solução da amostra é mais baixa do que 0,1 conduzir a extração em n-butil-acetato como a seguir descrito.

Colocar uma alíquota ou toda a solução da amostra (1-15ug de Mo, quando extraído em 10 ml de (n-butil-acetato), em funil de separação pequeno. Acrescentar uma quantidade exatamente medida de acetato de n-butil (10-20 ml), agitar vigorosamente por 1-2 minutos e deixar em repouso para a separação das fases. Retirar a fase aquosa, acrescentar pequena quantidade de água destilada e solução de SnCl₂ até a cor amarela do ferro desaparecer por completo. (Cerca de 10 ml da solução de SnCl₂ é usualmente requerida).

Agitar suavemente, deixar em repouso para a separação das fases, retirar a fase aquosa, e se a fase de acetato de n-butil estiver turva, clarear por centrifugação. Efetuar a leitura da absorvância no comprimento de onda de 460 nm, contra a prova em branco. Determinar o conteúdo de Mo através da curva de calibração preparada com absorvância de várias alíquotas (1-15 ug de Mo) da solução padrão, cujas as cores foram desenvolvidas nas mesmas condições das da solução da amostra.

B) Método de absorção atômica

Reagentes:

- a) Solução padrão estoque (A) de molibdênio (1 mg/l): Umedecer 1,5000 g de óxido de molibdênio (MoO_3), padrão primário, (previamente seco, no mínimo, por 24 horas, em dessecador com H_2SO_4) com pequena quantidade de água destilada, acrescentar cerca de 5 g de NaOH para dissolver completamente, diluir exatamente a um litro com água destilada. Guardar em frasco escuro.
- b) Solução padrão de trabalho de molibdênio (10 ug/ml): Diluir 10 ml da solução padrão estoque A a 1 litro com água destilada. Guardar em frasco escuro.
- c) Solução de oxina ($\text{C}_9 \text{H}_6 \text{NOH}$) a 20%: Pesar 20 g de oxina, transferir para copo de 150 ml, adicionar 50 ml de ácido acético concentrado, aquecer em banho-maria até dissolver, esfriar, transferir para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com água destilada.
- d) Solução de HCl 1 N.
- e) 2-heptanona ou metil-isobutil-cetona.

Procedimento:

1. Para extração:

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C, para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

2. Para determinação:

- a) Transferir 1-5-10-15 e 20 ml da solução padrão de trabalho (10 ug/ml) para balão volumétrico de 100 ml; para a solução da amostra, transferir uma alíquota que contenha de 10 a 200 ug de Mo.
- b) Adicionar 10 ml de solução de HCl 1 N, 5 ml da solução de oxina e fazer um volume de aproximadamente 80 ml. Agitar vigorosamente e deixar em repouso por alguns instantes.
- c) Adicionar exatamente 5-10 ml de 2-heptanona ou metil-isobutil-cetona, agitar vigorosamente por 1-2 minutos e deixar em repouso por alguns instantes. Adicionar água destilada de maneira que a fase orgânica se localize na parte superior do pescoço do balão.
- d) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do molibdênio (lâmpada de cátodo oco para molibdênio, comprimento de onda 3130 Å e chama adequada).
- e) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões, aspirando a fase orgânica no queimador do aparelho.
- f) Lavar o queimador com água desmineralizada.
- g) Acertar novamente o zero com a prova em branco.
- h) Proceder as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.
- i) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (observâncias). Se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão.
- j) Determinar a concentração de molibdênio na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de molibdênio no material analisado.

3.14 Cobalto

A. Método colorimétrico de 2-nitroso-1,naftol

Reagentes:

OBS.:

-Usar água destilada livre de elementos interferentes. Testar a água agitando 2 gotas de solução a 0,01% de ditizona em tetracloreto de carbono (CCl_4) a 10ml de água: após a separação das fases, a solução de tetracloreto deve permanecer verde.

-Mistura ternária de ácido - Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), concentrado, a 100 ml de ácido nítrico (HNO_3), concentrado, misturar e acrescentar 40 ml de ácido perclórico (HClO_4) a 70%.

- Hidróxido de amônio, NH_4OH , concentrado p.a.

-Acetato de isoamila p.a. (de preferência desiladol).

-Solução de 2-nitroso-1-naftol a 0,05% - Dissolver 0,05 g de 2-nitroso-1-naftol em 8 gotas de NaOH 1 N e 1 ml de água destilada. Adicionar 50.60 ml de água destilada, 6,5-7 ml de NH_4OH concentrado e diluir a 100 ml com água. Dividir essa solução em dois tubos de centrífuga de 100 ml, adicionar 20 ml de acetato de isoamila, agitar por 30 segundos e centrifugar. Repetir essa operação adicionando mais 20 ml de acetato de isoamila. Pode ser necessário remover parte da fase aquosa para assegurar a completa remoção de matéria estranha na interface.

-Soluções padrões de cobalto.

- Solução padrão estoque contendo 200 microgramas de cobalto por mililitro. Dissolver 0,0808 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água destilada e completar a 100 ml.

Solução padrão de trabalho contendo 2 microgramas de cobalto por mililitro. Diluir 10 ml da solução estoque a 1 litro com água destilada.

Solução de tiosulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a 10%.

Solução de citrato diamônico, $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, a 20%.

Solução alcoólica de fenolftaleína a 1%.

Solução de hidróxido de amônio, NH_4OH , (1+1).

Equipamentos: Calorímetro ou espectrofotômetro.

Preparo da curva padrão:

a) Transferir 0,0-1,0.1,5-2,0 e 2,5 ml da solução padrão de trabalho de cobalto para tubos de centrífuga de 50 ml.

b) Adicionar 10 ml da solução de citrato diamônico a 20% e 2 gotas da solução de fenolftaleína. Adicionar, gota a gota, solução de NH_4OH (1+1) até obter a cor rósea do indicador e acrescentar, sucessivamente, 1 ml da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a 10%, 2 ml da solução de 2-nitrosol.1.naftol a 0,5% e 5 ml de acetato de isoamila.

OBS.: Somente o volume da solução de acetato de isoamila deve ser medido com rigor.

c) Tampar o tubo e agitar manualmente por 5 minutos e deixar em repouso para a separação das fases. Centrifugar, se necessário.

d) Retirar e descartar a fase aquosa aspirando-a, a vácuo, por meio de um tubo de vidro capilar.

e) Lavar a fase de acetato de isoamila por duas vezes com porções de 5 ml de solução 1 N de NaOH e uma vez com 5 ml de solução de HCl 1 N, agitando por 5 minutos após cada adição, deixando as fases se separarem e retirando e descartando a fase aquosa.

f) Centrifugar por 2 minutos a 1500 r pm, descartar a fase aquosa, se houver, transferir a fase de acetato de isoamila para tubo de colorímetro ou espectrofotômetro e medir a transmitância ou absorvância da solução a 530 nanômetros.

g) Construir a curva padrão, e, se houver conveniência, estabelecer a equação de regressão, relacionando as quantidades de cobalto com as respectivas absorvâncias.

Procedimento:

- a) Pesar 2,0000 g da amostra, transferir para copo de 150 ml e adicionar lentamente 20 ml da mistura ternária de ácido.
- b) Cobrir com vidro de relógio e digerir em banho-maria; durante a noite.
- c) Transferir para uma chapa aquecedora e aquecer coberto até o aparecimento de densos fumos brancos de HClO_4 e retirar da chapa (Cuidado para não deixar perder significantes quantidades de HClO_4).
- d) Diluir com um pouco de água, transferir para balão volumétrico de 50 ml e completar o volume e agitar. Transferir o conteúdo do balão para um tubo de centrífuga de 100 ml, e centrifugar por 5 minutos a 2.000 r pm.
- e) Transferir uma alíquota, contendo de 2 a 5 microgramas de cobalto, para tubo de centrífuga de 50 ml e prosseguir a partir do item b, do preparo da curva padrão.
- f) Determinar a quantidade de cobalto na alíquota analisada, através da curva padrão ou da equação de regressão. Calcular a seguir a percentagem de cobalto no material analisado.

8. Método para absorção atômica

Reagentes:

Solução de ácido clorídrico, HCl , p.a.

Solução de ácido nítrico, HNO_3 , p.a.

Solução padrão estoque (A) de cobalto, contendo 1000ug/ml. Dissolver 4,0530 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 20 ml de solução de HCl (1+1). Transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar o volume. Solução padrão estoque (8) de cobalto, contendo 100ug/ml. Transferir 10 ml da solução estoque (A) para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume. Soluções padrões de trabalho de cobalto, contendo 0,0-2,0-4,0-6,0-8,0 e 10 ug/ml. Transferir 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml da solução estoque (8) para balões volumétricos de 100 ml e completar o volume.

Procedimento:

A) Para extração ,

Proceder conforme descrito no item 1, do procedimento do método C, para extração do cálcio, excluindo o uso da solução de lantânio.

B) Para a determinação

a) Colocar o aparelho nas condições exigidas para a determinação do cobalto (lâmpada de cátodo oco para cobalto, comprimento de onda 2410 A e chama adequada).

b) Acertar o zero do aparelho com a prova em branco e fazer as leituras das soluções padrões.

c) lavar o queimador com água desmineralizada.

d) Acertar novamente o zero com a prova em branco.

e) Proceder as leituras das soluções das amostras, lavando o queimador após cada leitura. Após 6-12 leituras de soluções de amostras, acertar novamente o zero com a prova em branco e repetir as leituras das soluções padrões.

f) Construir a curva padrão a partir da relação entre os valores das concentrações das soluções padrões e as médias das respectivas leituras (absorbância), estabelecer a equação de regressão.

g) Determinar a concentração de cobalto na solução da amostra, através da curva padrão ou da equação de regressão; calcular a seguir, a percentagem de cobalto no material analisado.

3.15 Biureto

Reagentes:

- a) Solução alcalina de tartarato -dissolver 40 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 500 ml de água destilada, esfriar, adicionar 50 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e diluir a 1 litro. Deixar em repouso por 24 horas antes de ser usada.
- b) Solução de sulfato de cobre -Dissolver 15 g de sulfato de cobre ($\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em água livre de CO_2 e diluir a 1 litro.
- c) Solução padrão de biureto, contendo 1 mg/ml -Dissolver 0,5000 g de biureto p.a. em água destilada morna e livre de CO_2 , esfriar, transferir para balão volumétrico de 500 ml e completar o volume.
- Nota: O biureto pode ser purificado da seguinte maneira: dissolver 10 g de biureto em 1 litro de álcool absoluto e concentrar por aquecimento suave a cerca de 250 ml. Esfriar a 5°C e filtrar através de um cadinho com placa de vidro sinterizado de porosidade adequada. O rendimento é de 60%- Repetir a cristalização e secar o produto final em estufa a vácuo a 80°C .
- d) Solução de hidróxido de sódio (NaOH), 1 N.
- e) Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 0,1 N.
- f) Solução de vermelho de metila a 0,5%.
- g) Resina de troca iônica -REXYN 101 (H) (Ficher Scientific CO) ou similar -com uma bureta de 50 ml, fazer uma coluna de + - 10 cm de resina, usando lã de vidro sobre a torneira. A coluna deve ser regenerada após cada uso, passando 100 ml de solução de H_2SO_4 (1+9) ou de HCl (1+4) através da coluna a uma velocidade de + - 5 ml/minutos e, em seguida, lavando com água até o pH do eluido ser maior do que 6.

Equipamento:

- Banho de água com temperatura controlada ($30 \pm 5^\circ\text{C}$).
- Espectrofotômetro ou clorímetro dotado de filtro para 500-570 nm, ambos com capacidade para células de 2 a 4 cm.

Preparo de curva padrão:

- a) Transferir 2,5.10-20-30-40 e 50 ml da solução padrão de biureto para balões volumétricos de 100 ml.
- b) Diluir aproximadamente 50 ml com água destilada livre de CO_2 . Adicionar 1 gota da solução de vermelho de metila e neutralizar com solução de ácido sulfúrico 0,1 N até obter a cor rósea do indicador .
- c) Adicionar com agitação, 20 ml da solução alcalina de tartarato e depois 20 ml da solução de sulfato de cobre.
- d) Completar o volume, agitar dez segundos e colocar os balões em banho de água a $30 \pm 5^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
- e) Desenvolver uma prova em branco.
- f) Determinar a absorvância de cada solução contra a prova em branco a 555 nm (instrumentos com filtro de 500-570 nm podem ser usados), usando célula de 2-4 cm. Confeccionar a curva padrão ou estabelecer a equação de regressão.

Procedimento:

A) Em Uréia

- a) pesar de 2,000 g a 5,000 g de amostra, transferir para copo de 250 ml, adicionar 100 ml de água destilada quente ($\pm 50^\circ\text{C}$) e agitar continuamente nessa temperatura por 30 minutos.
- b) Filtrar por papel S&S, faixa branca ou equivalente para um balão Volumétrico de 250 ml lavando o copo e filtro com porções de 10 ml de água destilada quente. Esfriar e completar o volume.
- c) Transferir uma alíquota de 25 ml da solução para balão volumétrico de 100 ml e desenvolver a cor como descrito no preparo da curva padrão a partir do item b.

- d) Através da curva padrão ou da equação de regressão, obter a quantidade de biureto, em mg na alíquota analisada.
e) Calcular a percentagem de biureto. pela expressão:

$$\% \text{ de biureto} = \frac{A}{P}$$

onde:

A = massa (mg) de biureto na alíquota analisada.

p = peso (g) da amostra

B = em mistura

- a) Pesar de 10,000 a 20,000 g da amostra, transferir para copo de 250 ml -adicionar 150 ml de água destilada quente (+ - 50°C) e agitar continuamente nessa temperatura por 30 minutos.
b) Filtrar por papel S&S 589, faixa branca ou equivalente para um balão de 250 ml, lavando o copo e o filtro com porções de 10 ml de água destilada quente. Esfriar e completar o volume.
c) Transferir 25 ml da solução para a coluna de resina; ajustar o fluxo para 4 a 5 ml/minuto, recebendo o eluido num balão volumétrico de 100 ml. lavar a coluna com 2 porções de 25 ml de água destilada.
d) Adicionar 2 gotas de solução de vermelho de metila no balão e a solução de NaOH até a viragem do indicador para amarelo. Acrescentar em seguida solução de H₂SO₄ 0,1 N até a solução voltar a ser rósea e completar o volume.
e) Transferir uma alíquota de 50 ml para balão volumétrico de 100 ml e desenvolver a cor, como descrito no preparo da curva padrão a partir do item b.
f) Através da curva padrão ou da equação de regressão obter a quantidade de biureto, em mg, na alíquota analisada.
g) Calcular a percentagem de biureto mediante a expressão :

$$\% \text{ de biureto} = \frac{2A}{P}$$

A = massa (mg).de biureto na alíquota analisada.

p = peso (g) da amostra.

CAPITULO II

Fertilizantes orgânicos e organo-minerais

PREPARO DA AMOSTRA

- a) Homogeneizar toda a amostra e reduzir, por quarteação manual, a 200 g, aproximadamente.
b) Retirar do total, cerca de 20 g, para determinação do pH.
c) Colocar a fração restante, em uma bandeja, tarada, pesar e anotar o peso (p).
d) Levar à estufa à temperatura de 65°C, durante 16 horas.
e) Retirar da estufa, esfriar à temperatura ambiente, pesar e anotar o peso(Pi).
f) Homogeneizar, dividir por quarteação manual, em duas frações iguais.
Uma das frações destina-se à análise granulométrica e a outra deve ser moída e passada integralmente em peneira de malha de 0,5 mm e será utilizada para as demais determinações.

2. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

Proceder conforme o caso, de acordo com o estabelecido no Capítulo I, item 2.

3. ANÁLISES QUÍMICAS

3.1 Ph

Reagentes:

Solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01 M - Preparar uma solução de CaCl_2 1 M, aproximadamente, padronizar através da determinação de cloreto, utilizando o método descrito no item 3.2.14 do Capítulo I. Preparar a solução 0,01 M por diluição desta.

Equipamento:

- Medidor de pH.

Procedimento:

- Pesar 10 g da parte da amostra reservada para tal (amostra "in natura"), transferir para copo de 100 ml, adicionar 50 ml de solução de CaCl_2 0,01 M, agitar e deixar em repouso durante 30 minutos, agitando, ocasionalmente.
- Medir o pH da suspensão, expressando o resultado com a indicação "pH em solução 0,01 M de CaCl_2 ".

3.2 Umidade a 65°C.

Calcular o percentual de umidade da amostra, eliminando a 65°C, utilizando os dados (p e P_1) obtidos no item 1, letras c e e do p: eparo da amostra, pela expressão:

$$U_{65^\circ\text{C}} = \frac{100 (P - P_1)}{P}$$

onde: .

p = peso (g) da amostra "in natura" e após a retirada da fração para a det. do pH.

P_1 = peso (g) da amostra seca a 65°C.

3.3 Matéria orgânica total.

Equipamento:

- Forno ou mufla.

Procedimento:

- Pesar 5,0 g da amostra, transferir para cápsula de porcelana, tarada e levar à estufa a 100-110°C, durante 3 horas.
- Retirar da estufa, esfriar em dessecador e pesar (P_1).
- Transferir para uma mufla e elevar a temperatura até atingir 550°C, mantendo a porta entreaberta para proporcionar adequada aeração. Fechar a porta, e manter nessa temperatura por mais 1 hora.
- Retirar da mufla, esfriar em dessecador, e pesar (P_2).
- Calcular o teor de matéria orgânica total na amostra pela expressão:

$$= \% \text{ matéria orgânica total} = \frac{(P_1 - P_2) \cdot (100 - U_{65^\circ\text{C}})}{5}$$

onde:

P_1 = peso (g) da amostra seca a 100-110°C.

P_2 = peso (g) do resíduo após a ignição à 550°C.

$U_{65^\circ\text{C}}$ = % de umidade eliminada a 65°C, determinado em 3.2.

3.4 Nitrogênio total

Determinar por um dos métodos descritos para a determinação de nitrogênio total em fertilizantes minerais (Cap.I . item 3.1 .)

Calcular a percentagem de nitrogênio total na amostra, pela expressão:

$$\%N = \frac{(V_1N_1 - V_2N_2) - (V_3N_1 - V_4N_2) \cdot 14007 (100 - U_{65^\circ C})}{G \cdot 100}$$

sendo que:

V1, V2, V3' V4, N1, N2 e G, têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

U65°C = % de umidade eliminada a 650C, determinado em 3.2.

3.5 Cálculo da relação carbono total/nitrogênio total

Calcular a relação C/N na amostra, sendo o percentual de carbono total obtido pela expressão:

$$\%C = \frac{\% \text{ matéria orgânica total (item 3.3)}}{1,8}$$

e o percentual de N total, o já obtido conforme o item 3.4.

3.6 Fósforo

3.6.1 Fósforo total

Proceder conforme descrito no item 3.2.1 do Capítulo I.

Calcular a percentagem de fósforo total na amostra pela expressão:

$$\% P_2O_5 \text{ total} = \frac{(m \times 801,75) (100 - U_{65^\circ C})}{100V}$$

sendo:

U65°C = % de umidade eliminada; m e V têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

3.6.2 Fósforo solúvel em água

Proceder conforme descrito no item 3.2.2 do Capítulo I.

Calcular a percentagem de P₂O₅ solúvel em água na amostra pela expressão:

$$\% P_2O_5 \text{ solúvel em água} = \frac{m \times 801,75 (100 - U_{65^\circ C})}{100V}$$

sendo:

U65°C = % de umidade eliminada; m e V têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

3.6.3 Fósforo solúvel em água mais fósforo solúvel em solução neutra de citrato de amônio

Proceder conforme descrito no item 3.2.2 do Capítulo I. Calcular a percentagem de P₂O₅ solúvel em água mais o solúvel em solução neutra de citrato de amônio, na amostra, pelas expressões:

A) Método indireto

% P₂O₅ insolúvel em citrato neutro de amônio

$$= \frac{3,207 \cdot m \cdot V \cdot (100 - U_{65^\circ C})}{100}$$

$$100V_1$$

sendo:

U65°C = % de umidade eliminada; m, V e V₁ têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

% P₂O₅ solúvel em água + P₂O₅ sol. em solução neutra de citrato de amônio = P₂O₅ total - % P₂O₅ insolúvel em citrato de amônio.

B) Método direto

% P₂O₅ sol. em água + % P₂O₅ sol. em solução neutra de citrato de amônio.

$$= \frac{1.603,5 \cdot m(100 - U_{65^\circ C})}{100 \cdot V}$$

sendo:

U65°C = % de umidade eliminada a 65°C; m e V têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

3.6.4 Fósforo solúvel em solução de ácido cítrico a 2%, relação 1/100.

Proceder conforme descrito no item 3.2.4 do Capítulo I.

Calcular a percentagem de P₂O₅ solúvel em solução de ácido cítrico a 2%, relação 1/100, pela expressão:

$$\% P_2O_5 = \frac{m \times 801,75 (100 - U_{65^\circ C})}{100 V}$$

sendo:

U65°C = % de umidade eliminada a 65°C; m e V têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

3.7 Potássio

Proceder conforme descrito no item 3.2.5 do Capítulo I. No caso de se empregar o método fotométrico de chama, adicionar 2 g de carvão ativo antes da fervura.

Calcular a percentagem de K₂O na amostra pelas expressões:

A) Método do tetrafenilborato de sódio:

$$\% K_2O = \frac{F_2[V_3 - (2V_4F_1)] \times (100 - U_{65^\circ C})}{m}$$

sendo:

U65°C = % umidade eliminada a 65°C, F₁, F₂, F₃, V₃, V₄ e m têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

B) Método fotométrico de Chama

$$\% K_2O = \frac{L \cdot 0,5 \cdot (100 - U_{65^\circ C})}{100P}$$

sendo:

U65°C = % umidade eliminada a 65°C; L e p têm os mesmos significados apresentados no método em referência.

CAPITULO III

Corretivos

1. PREPARO DA AMOSTRA

Homogeneizar toda a amostra e dividi-la, por quarteação em duas frações iguais. Uma das frações destina-se à análise granulométrica e outra, às análises químicas.

A fração destinada à análise granulométrica deverá ser previamente seca em estufa, à temperatura de 105-110°C, até peso constante e a destinada às análises químicas não será submetida a nenhum preparo, sendo utilizada tal qual foi coletada.

2. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

Equipamento:

- Peneiras com aro de 20cm de diâmetro, 5cm de altura e aberturas de malha de 2mm (ABNT N° 10) e de 0,3mm (ABNT N° 50). Agitador mecânico vibratório.

Procedimento:

- a) Pesar, integralmente, a fração da amostra reservada para tal, com precisão de 0,1g.
- b) Colocar sobre peneiras encaixadas, simultaneamente, uma sobre a outra, ficando a de maior abertura de malha, acima.
- c) Agitar durante 5 minutos, no agitador mecânico.
- d) Pesar as frações retidas em cada peneira.
- e) Calcular o percentual, de acordo com as fórmulas:

$$\% \text{ da amostra passando na peneira n}^\circ 10 = \frac{R_1 \times 100}{G}$$

$$\% \text{ da amostra passando na peneira n}^\circ 50 = 100 - \frac{(R_1 + R_2) \times 100}{G}$$

onde:

G = peso (g) da amostra analisada.

R₁ = peso (g) do material retido na peneira n° 10.

R₂ = peso (g) do material retido na peneira n° 50.

3. ANÁLISES QUÍMICAS

3.1 Poder de neutralização (PN)

A - Método da titulação com indicador

Reagentes:

- a) Solução de HCl 0,5 N, padronizada.
- b) Solução de NaOH 0,25 N, padronizada.
- c) Solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %.

Procedimento:

a) Transferir 1,0000g da amostra (se calcário) ou 0,5000g (se calcário calcinado ou cal hidratado) para frasco de erlenmeyer de 250ml.

b) Adicionar exatamente 50ml da solução de HCl padronizada, e ferver suavemente por 5 minutos.

c) Esfriar, acrescentar 2-3 gotas de solução de fenolftaleína e titular o excesso do ácido com a solução padronizada de NaOH, até o aparecimento de uma leve cor rosada do indicador. Anotar o volume gasto.

d) Calcular o poder de neutralização do material, em % de CaCO₃ equivalente, pela expressão:

$$PN (\% \text{ CaCO}_3 \text{ equivalente}) = \frac{5(50.N_1 - V_2.N_2)}{g}$$

onde:

N₁ = normalidade da solução de HCl.

V₂ = volume (ml) da solução de NaOH, gasto na titulação.

N₂ = normalidade da solução de NaOH.

g = massa (g) da amostra, analisada.

B Método da titulação potenciométrica

Reagentes:

a) Solução de HCl 0,5 N, padronizada.

b) Solução de NaOH 0,25 N, padronizada.

Equipamento:

- Medidor de pH.

-- Agitador magnético.

Procedimento:

a) Transferir 1,000g da amostra (se calcário) ou 0,500g (se calcário calcinado ou cal hidratado) para erlenmeyer de 250ml.

b) Adicionar exatamente 50ml da solução padronizada de HCl e ferver suavemente por 5 minutos.

c) Esfriar e transferir todo o material para um copo de 250 ml.

d) Colocar o copo sobre o agitador magnético, introduzir o eletrodo do medidor de pH, e colocar sobre o copo uma bureta contendo a solução padronizada de NaOH.

e) Ligar o agitador magnético, promovendo uma agitação moderada e titular com a solução de NaOH, padronizada, rapidamente até o pH da solução apresentar valor 5. Continuar a titulação gota a gota até o pH atingir o valor 7, e assim permanecer por 1 minuto enquanto a solução é agitada.

Anotar o volume gasto.

f) Calcular o poder de neutralização do material, em % de CaCO₃ equivalente, pela expressão:

$$PN (\% \text{ de CaCO}_3 \text{ equivalente}) = \frac{5(50.N_1 - V_2.N_2)}{g}$$

onde:

N₁ = normalidade da solução de HCl.

V₂ = volume (ml) da solução de NaOH, gasto na titulação.

N₂ = normalidade da solução de NaOH.

g = massa (g) da amostra, analisada.

3.2 Cálcio

A) Método permanganométrico

Idêntico ao método A, para determinação do cálcio em fertilizantes.

A percentagem de CaO é calculada pela expressão:

$$\% \text{ de CaO} = \frac{(V_1 - V_2) N_1 \cdot 2,804}{g}$$

P₁

em que V₁, V₂, N₁, e P₁ têm o mesmo significado descrito no método em referência.

B) Método quelatométrico de EDTA (Não aplicável à produtos com alto teor do fosfato, ferro, manganês e outras impurezas).

Reagentes:

- a) Solução de ácido clorídrico (HCl) (1 + 1).
- b) Solução de ácido nítrico (HNO₃) (1+1).
- c) Solução de hidróxido de potássio - cianeto de potássio - Dissolver 280g de KOH e 2g de KCN, em 1 litro de água destilada.
- d) Solução de EDTA 0,010 M - Dissolver 3,7225g de sal dissódico di-hidratado do ácido etilenodiamino tetracético previamente seco a 70-80°C, por 2 horas, em água destilada e completar o volume a 1 litro. Caso o EDTA não seja de elevado grau de pureza, padronizar essa solução, utilizando a solução padrão de cálcio 0,010 M, do procedimento para determinação do cálcio, adiante.
- e) Solução padrão de cálcio 0,010 M - Dissolver 1,000g de carbonato de cálcio (CaCO₃) padrão primário, previamente seco a 105°_110°C, por 1 ora, em um volume mínimo de solução de HCl (1+1) e completar o volume a 1 litro, com água destilada.
- f) Indicador: calceina ou calcon ou murexida.

Calceina - Moer a mistura formada de 0,2g de calceina, 0,12g de timolftaleina e 20g de nitrato de potássio (KNO₃).

Solução de calcon - Transferir 100mg de calcon para um copo de 100ml, contendo 10ml de trietanolamina e 10ml de álcool metílico. Esperar dissolver, transferir para recipiente de plástico e conservar em geladeira (duração: 30-45 dias).

Murexida - Moer a mistura formada de 0,1g de murexida e 10g de cloreto de sódio (NaCl). Conservar em frasco escuro, bem fechado.

Procedimento:

1. Para extração:

- a) Transferir 0,500g da amostra para copo de 250ml, umedecer com água destilada e adicionar lentamente 20ml da solução de HCl (1+1), 2ml da solução de HNO₃ (1+1) e cobrir com vidro de relógio.
- b) Ferver suavemente durante 10 minutos.
- c) Esfriar, transferir para balão de 250 ml, completar o volume e agitar. Filtrar ou deixar decantar.

2. Para determinação:

- a) Transferir 10ml do extrato para erlenmeyer de 250ml.
- b) Adicionar 100ml de água destilada, 5ml da solução KOH-KCN e 15 ± 1mg do indicador calceina, ou 6 gotas da solução do indicador calcon ou 0,2 - 0,4g do indicador murexida, agitando após a adição de cada reagente.
- c) Titular imediatamente o cálcio com a solução de EDTA 0,010 M, agitando continuamente até a mudança permanente da cor do indicador: a calceina muda de verde fluorescente para rosa; o calcon muda de vinho para azul puro; e a murexida muda de vermelho para violeta intenso. Anotar o volume (V₁) da solução de EDTA consumido.
- d) Desenvolver uma prova em branco e anotar o volume consumido (V₂).
- e) Calcular a percentagem de CaO, mediante a expressão:

$$\% \text{ CaO} = 280,4 \times (V_1 - V_2) \cdot M$$

onde:

V_1 = volume (ml) da solução de EDTA gasto na titulação.

V_2 = volume (ml) da solução de EDTA gasto na titulação da prova em branco.

M = molaridade da solução de EDTA.

3.3 Magnésio

A) Método gravimétrico do pirofosfato

Idêntico ao método A, para determinação do magnésio em fertilizantes.

A percentagem de MgO é calculada pela expressão:

$$\% \text{ MgO} = \frac{P_2 \times 36,22}{P_1}$$

onde:

P_1 e P_2 têm o mesmo significado descrito no método em referência.

B) Método quelatométrico do EDTA

(Não aplicável a produtos com alto teor de fosfato, ferro, manganês e outras impurezas).

Reagentes:

a) Solução tampão de pH 10 - Dissolver 67,5g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em água destilada, acrescentar 570ml de hidróxido de amônio (NH_4OH) concentrado, 2g de KCN, 50ml de trietanolamina, 0,616g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0,931g de EDTA dissódico di-hidratado. Completar o volume a 1 litro e homogeneizar.

b) Solução de eriocromo preto T a 0,5% - Dissolver 0,25 do indicador e 2g de cloridrato de hidroxilamina em 50ml de metanol.

Procedimento:

1. Para extração:

Utilizar o mesmo extrato preparado para a extração do cálcio.

2. Para determinação:

a) Transferir 10ml do extrato para erlenmeyer de 250ml

b) Adicionar 100ml de água destilada, 5ml da solução tampão de pH 10 e 10 gotas da solução de eriocromo preto T, agitando após a adição de cada reagente.

c) Titular imediatamente o cálcio mais magnésio com a solução de EDTA 0,010 M até a viragem do indicador, da cor vermelha vinho para azul puro e estável. Anotar o volume (V_3) da solução de EDTA consumido.

d) Desenvolver uma prova em branco e anotar o volume (V_4) consumido.

e) Calcular a percentagem de MgO, mediante a expressão:

$$\% \text{ MgO} = 201,6[(V_3 - V_4) - (V_1 - V_2)]$$

onde:

V_1 = volume (ml) da solução de EDTA gasto na titulação do cálcio.

V_2 = volume (ml) da solução de EDTA gasto na titulação da prova em branco do cálcio.

V_3 = volume (ml) da solução de EDTA gasto na titulação do cálcio mais magnésio.

V_4 = volume (ml) da solução da prova em branco do cálcio mais magnésio.

CAPITULO IV

Inoculantes

1. PREPARO DA AMOSTRA

A abertura dos pacotes deverá ser realizada em sala asséptica, a fim de evitar contaminações.

Antes da abertura, os pacotes deverão ser desinfetados externamente, com algodão embebido em álcool 75°.

2. MÉTODOS PARA CONTAGENS DE RHIZOBIUM

Deverão ser observados os dois métodos, a seguir, para a contagem de Rhizobium em inoculantes:

- a) o método da diluição e contagens em placas e
- b) o método da diluição e infecção em plantas, também conhecido como método do número mais provável (NMP).

2.1 Método da Diluição e Contagem em Placas

Este método apresenta sérios inconvenientes quando empregado para inoculantes preparados com turfas não esterilizadas, particularmente, para inoculantes que se encontram próximos do final do prazo de sua validade. O inconveniente do método prende-se ao fato de que o meio de cultivo não é seletivo e normalmente os contaminantes predominam sobre o Rhizobium que se deseja contar, tornando, às vezes, a contagem impraticável. Esse fato não impede, entretanto, que o método seja tentado, visto que, quando bem sucedido, os resultados são obtidos no período de três a sete dias, dependendo da espécie de Rhizobium. Para rizóbios de crescimento rápido (associados com alfafa, trevo, feijão, etc.), o resultado pode ser obtido em três-quatro dias, e para os de crescimento lento (soja, tremoço e, praticamente, todas as leguminosas tropicais) o resultado tarda cinco-sete dias.

2.1.1 Meio de Cultura

O meio de cultura é o seguinte:

1. Manitol	10,0g
2. Água de levedura	100,0ml
3. $K_2 HPO_4$	0,5g
4. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,8g
5. NaCl	0,2g
6. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01g
7. Ágar-ágar	15g
8. H_2O destilada	1000 ml (para completar)
9. Vermelho-congo	10ml

Preparo de água de levedura:

Suspender 100g de fermento de padaria em 900ml de H_2O e autoclavar por 10 - 15 minutos a 121°C. Deixar decantar (12 - 15 h) preferivelmente em geladeira.

Distribuir o sobrenadante em frascos de 100ml, esterilizar e guardar em geladeira até o momento de uso.

Preparo de solução estoque de sais:

Solução A

K_2HPO_4 - Preparar solução estoque de 50g/litro; usar 10 ml/litro de meio.

Solução B

$MgSO_4$ e

$NaCl$ - Preparar uma solução estoque com 80g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /litro e 20g $NaCl$ /litro; usar 10 ml/litro.

Solução C

$FeCl_3$ - Preparar uma solução estoque com 10g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ /l, adicionando-se algumas gotas de HCl para manter o sal em solução; guardar em geladeira e usar 1 ml/litro.

Vermelho-congo - Solução aquosa 1:400. Adicionar 10 ml/litro após completado o volume do meio preparado.

Para facilitar a distribuição nas placas, o meio deve ser esterilizado em recipientes contendo 250ml cada. A esterilização é feita a $121^\circ C$, por 15 minutos, e a distribuição é feita assepticamente na base de 15 - 20 ml/placa.

2.1.2 Preparo das Diluições e inoculação das placas

As diluições devem ser preparadas conforme o esquema apresentado na figura 1. O primeiro frasco deve ser agitado vigorosamente, mantendo-o com as duas mãos e efetuando movimento de vaivém na maior extensão possível, por 50 vezes (ida e volta é igual a uma vez). O segundo frasco pode ser agitado pelo mesmo processo, por dez vezes. Um agitador de movimento horizontal alternado pode substituir a agitação manual. Os tubos das diluições seguintes são agitados sugando e soltando a suspensão por seis vezes, com a pipeta a ser usada na transferência para a diluição seguinte. A água usada para o preparo das diluições e as pipetas para as transferências devem ser esterilizadas. Todos os cuidados normais de assepsia devem ser observados durante as transferências. Uma única série de diluições é suficiente para a inoculação em placas e em plantas. Para um serviço de contagens de rotina é interessante substituir as pesagens de um grama de inoculante por medidas calibradas por esse peso. Como a densidade da turfa é variável com as procedências é conveniente adotar uma medida calibrada para cada fabricante. Para verificação do erro que se comete com medidas ao invés de pesagens, é conveniente secar o primeiro frasco da série de diluição para determinação do peso da turfa medida. Um erro de 15% ($1,0 \pm 0,15g$) não justifica correções. É evidente que o erro pode também ser determinado a priori.

A alíquota de 0,1ml das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , são inoculadas na superfície do meio de cultura. Esse inóculo deve ser uniformemente distribuído na superfície do meio, usando-se para isso um bastão de vidro com uma extremidade em triângulo.

A incubação deve ser feita a $28^\circ C$ e a primeira observação para acompanhar o desenvolvimento das colônias de *Rhizobium* efetuada no 2º e 4º dias da incubação, respectivamente, para as bactérias de crescimento rápido e lento.

As colônias de *Rhizobium* são circulares, com bordas bem definidas, e não absorvem o corante, sendo, portanto, translúcidas ou ligeiramente leitosas conforme sua idade.

Três repetições serão feitas para cada diluição, e cada amostra a ser contada deverá ser repetida (preparo de duas séries de diluições) pelo menos uma vez.

2.1.3 Contagem das Colônias e Cálculo do Número de Rhizobium Utilizar contadores-registradores de colônias, para contagens em meios com culturas puras ou inoculantes esterilizados. No caso de inoculantes com turfa não esterilizada, com Rhizobium de crescimento lento, recorrer a contagens sob lupa, o que facilita o reconhecimento das colônias.

Devem ser contadas as placas da diluição que contiverem entre 30 e 300 colônias, preferindo-se nessa faixa a diluição com menos colônias por placas.

O número de Rhizobium é dado pela fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de Rhizobium/grama de inoculante} = f \times N$$

onde:

f = fator de diluição e N = número médio de Rhizobium/placa.

O fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa contada. A diluição na placa contada é dada pelos produtos das diluições efetuadas e pela quantidade plaqueada.

Considerando-se o plaqueamento de 0,1ml das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , o cálculo pode ser efetuado, empregando-se os seguintes fatores:

Diluição	Fator (f)	Nº de Rhizobium/g de inoculante
10^{-5}	10^6	$N \times 10^6$
10^{-6}	10^7	$N \times 10^7$
10^{-7}	10^8	$N \times 10^8$

O inoculante será considerado fora do padrão (deficiente) se uma das contagens for inferior a 10×10^6 bactérias/g, mesmo que a média seja superior a esse mínimo.

O resultado obtido refere-se à turfa com o teor de umidade da amostra, sendo esse o dado que deve ser utilizado para fins de controle. É interessante, entretanto, efetuar determinações dos teores de umidade das amostras a serem controladas. É, também interessante que sejam efetuadas contagens do número total de microorganismos no inoculante sob controle.

2.2 Diluição e Infecção em Plantas (NMP)

O método da diluição e infecção em plantas é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação de diluições crescentes em plantas testes cultivadas em condições assépticas. É aplicável quando se pretende efetuar contagens de Rhizobium em presença de outros microorganismos, como é o caso do inoculante. Tem a desvantagem de demandar maior tempo para a obtenção de resultados, visto que há necessidade de aguardar a formação dos nódulos. Para que os resultados possam ser obtidos em 15 - 25 dias, é necessário que as plantas se desenvolvam em condições controladas de temperatura e luminosidade.

Embora seja mais demorado e trabalhoso que o processo das diluições em placa, o NMP deverá ser o método de escolha para contagens de Rhizobium em inoculantes com prazos de validade próximos da expiração.

Esse método pressupõe que a presença de uma bactéria será suficiente para induzir nodulação e se vale das tabelas de número mais provável (Tabela 1), para estimativa do número de bactérias no inoculo. As condições de cultivo das plantas devem ser ideais para propiciar rápida nodulação. Dois sistemas para cultivo de plantas podem ser adotados, dependendo do tamanho das sementes das plantas em teste.

A possibilidade de aproveitamento dos nódulos formados no teste, para a caracterização da estirpe empregada no inoculante, deve ser investigada.

Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o preparo dos vasos, diluição e condução do teste.

2.2.1 Esterilização das Sementes

Para sementes duras, que necessitam escarificação, a esterilização e escarificação podem ser feitas conjuntamente, usando ácido sulfúrico concentrado. As sementes são colocadas em tubos de ensaio e o ácido sulfúrico é adicionado em quantidade que permita a cobertura das sementes. Agita-se continuamente durante três a cinco minutos, drena-se o ácido e efetuam-se lavagens com água esterilizada por seis vezes no mínimo. A drenagem do ácido é importante, caso contrário dar-se-á violenta reação. Há despreendimento de calor durante o processo, porém esse calor não é suficiente para prejudicar a germinação da semente. Após a última lavagem, deixam-se as sementes em água, cerca de dez minutos para intumescimento, o que facilita a germinação. Para a maioria das leguminosas forrageiras (soja perene, siratrol), esse processo é aconselhável.

Para sementes que não necessitam escarificação (soja comum, feijão) a esterilização pode ser feita com bicloreto de mercúrio (HgCl_2) 1:500 durante três a cinco minutos. O cloreto de mercúrio é incolor e altamente tóxico. Seu manuseio deve ser cuidadoso, aconselhando-se a adição de um corante biológico (vg. azul de metileno) na solução preparada a fim de não confundí-lo com água. Decorrido o tempo de esterilização, as sementes devem ser lavadas no mínimo por seis vezes com água esterilizada. Como no caso anterior, devem ser mantidas em água para acelerar a germinação.

Para ambos os métodos, é conveniente efetuar uma imersão prévia das sementes em álcool 95% por 30 - 60 segundos.

2.2.2 Preparo das Diluições

A mesma série de diluições preparada para a contagem em placas pode ser usada para a inoculação em plantas.

As plantas, desenvolvendo-se em condições assépticas, são inoculadas com 0,1ml das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , ou com outra série de quatro diluições com fator 10 que se desejar (v.g. 10^{-5} a 10^{-8}).

No momento da inoculação, as plantas deverão estar com 7 - 15 dias de germinação.

2.2.2.1 Solução Nutritiva

A solução nutritiva adiante indicada deve ser usada para os dois sistemas de cultivo que serão descritos.

1. KCl	0,149g
2. K_2HPO_4	0,348g
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,493g
	Micronutrientes
4. Solução estoque nº 1	0,500ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,157g/litro
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,440g/litro
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,060g/litro
H_3BO_3	2,860g/litro
$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,020g/litro
5. Solução estoque nº 2	0,500ml
FeSO_4	0,5%
Ácido cítrico	0,5%

6. CaSO ₄ .2H ₂ O	0,688g
7. Água	1000,0 ml

Os sais devem ser adicionados à água na ordem em que estão indicados. O CaSO₄ deve ser adicionado por último, momentos antes do uso. Esse sal fica em suspensão e a solução nutritiva deve ser constantemente agitada no momento de sua distribuição. O pH final da solução nutritiva deve estar próximo de 6,5. Geralmente a correção deve ser feita para o valor 7,2. Pois, após a esterilização, o pH cai um pouco. É conveniente, entretanto, fazer uma verificação do pH final, após a esterilização.

2.2.3 Inoculação e Cultivo das Plantas

2.2.3.1 Sementes Pequenas

O teste de inoculantes recomendado para leguminosas com sementes de pequeno tamanho (v.g. alfafa, trevo, soja perene) poderá ser conduzido em tubos de ensaio com 200 x 25mm, com a solução nutritiva agarificada.

Na solução preparada conforme descrito anteriormente adiciona-se 1% de ágar-ágar e autoclava-se para liquefação do ágar. A correção do pH deve ser efetuada nessa primeira autoclavagem, que é feita para permitir a distribuição da solução nos tubos. Cada tubo deve receber 15 - 20 ml de solução nutritiva, ser tamponado com tampão de algodão e esterilizado a 121°C por vinte minutos. A distribuição da solução nutritiva nos tubos pode ser facilitada com o emprego de um sistema que consta de um funil reservatório e uma seringa que distribui volumes ajustáveis de líquido. Para tais tubos devem ser transportadas duas sementes recém-germinadas, com as raízes já apontadas, devendo ser imersas no ágar, corretamente orientadas. É conveniente que o plantio seja feito próximo à parede do tubo, de forma a possibilitar a observação dos nódulos sem necessidade de desfazer o sistema.

É óbvio que no momento da inoculação os tubos com plantas devem estar devidamente preparados, estando as plântulas com sete a quinze dias de idade.

Os tubos são então inoculados em duplicata ou quadruplicata com 0,1ml das diluições previamente indicadas. Convém notar que essas diluições devem ser preparadas no momento do uso. Os tubos são então colocados em suportes adequados, de forma que toda a extensão do ágar (parte das raízes) fique protegida da luz, e transferidos para a câmara de crescimento nas condições abaixo indicadas.

É aconselhável a inclusão de alguns tubos controles, não inoculados, para comprovar as condições de assepsia. Além disso, deve-se, pelo menos no princípio, incluir testes paralelos de contagens por diluição em placas e infecção em plantas com cultura pura da estirpe em teste no inoculante. Isso permitirá correlacionar as duas contagens e, mais importante ainda, verificar se a solução nutritiva está adequada para permitir boa nodulação.

É possível o aproveitamento dos nódulos formados nos tubos para outra fase do controle, que é a comprovação do uso de estirpes recomendadas oficialmente. Essa comprovação é feita através de testes sorológicos de aglutinação, cujo método está descrito no item 3.

Caso se pretenda aproveitar plantas desse teste para a comprovação sorológica das estirpes do inoculante, a observação dos nódulos deve ser efetuada sem desmanchar o sistema, deixando as plantas nas mesmas condições para permitir maior desenvolvimento dos nódulos.

Essas mesmas plantas podem ainda ser usadas para uma avaliação sumária da eficiência da estirpe (s) pela mensuração do peso seco das plantas. A diferenciação no desenvolvimento das plantas pode ser observada após cerca de dois meses. Nesse caso, é interessante incluir também tubos controles sem inoculação, e com a adição de KNO₃ em quantidade que permita uma concentração final de 0,05% do sal. É possível

que haja necessidade de adição de água esterilizada para permitir desenvolvimento das plantas nesse período.

Condições de Cultivo:

Condições ideais para nodulação são necessárias para que os nódulos possam ser observados visualmente em duas a três semanas após a inoculação. Deve-se sempre verificar se as condições da solução nutritiva são satisfatórias para Inoculação.

Condições satisfatórias de luminosidade podem ser obtidas com o emprego de tubos de lâmpada fluorescente (100 - 1000 lúmens por 12 horas a 25°C).

A iluminação deve ser lateral, sendo as lâmpadas mantidas dos dois lados de uma fileira de tubos com plantas, à distância de 7 a 13 cm. Durante 12 horas as plantas são mantidas no escuro, a 18-20°C.

2.2.3.2 Sementes Grandes

Para o caso de sementes grandes, usam-se vasos de Leonard, seguindo-se a mesma marcha. O ágar, que é usado como suporte das plantas nos tubos, é substituído por areia de rio lavada.

Preparo dos Vasos

Os vasos que constam de um reservatório para solução nutritiva e outro suporte das plantas, são improvisados com litros comerciais (encontrados em dois tamanhos) comuns. Os litros de diâmetro maior são cortados a cerca de 12 cm de altura para obtenção do reservatório da solução nutritiva. Os de diâmetro menor são cortados o mais próximo possível do fundo, para obtenção da parte para suporte das plantas. Um chumaço de algodão é usado para manter a areia no vaso.

Após a colocação da areia na parte superior, adicionam-se 500 ml da solução nutritiva, por vaso. Essa solução atinge a parte superior por capilaridade, sendo, entretanto, conveniente, no preparo dos vasos, adicionar 250ml no reservatório e o restante na areia. No momento da distribuição, a solução nutritiva deve ser constantemente agitada, para manter o sulfato de cálcio em suspensão. Após a adição da solução nutritiva, os vasos devem ser cobertos com saco de papel e esterilizados a 121°C durante 1,5 hora em autoclave.

Após a esterilização, os vasos são dispostos em casa de vegetação preparada para cultivo "asséptico".

Nos vasos devidamente preparados, faz-se o plantio de seis a dez sementes esterilizadas, cobrindo-se novamente os vasos até a germinação. Pode-se irrigar os vasos por cima conforme necessário até que haja bom desenvolvimento das plântulas. O desbaste é feito para duas a três plantas por vaso. Logo após o desbaste, inocula-se 1 ml/vaso de cada uma das diluições, com duas ou quatro repetições, deixando-se os controles conforme indicado para o caso dos tubos. Para obtenção de um bom "stand" é também aconselhável fazer germinar as sementes em condições assépticas e depois transplantar duas plântulas por vaso, quatro a oito dias após a germinação. Após confirmado o pegamento (um a dois dias após o transplante), inocula-se.

Caso se pretenda deixar controles com adição de nitrogênio, esse nutriente é adicionado no dia da inoculação, usando-se 10 ml de uma solução de NH_4NO_3 a 1,0%. Novas adições podem ser efetuadas, a julgar pelo desenvolvimento das plantas.

No caso dos vasos de Leonard, o sistema deve ser desfeito para avaliação da nodulação. Essa avaliação pode ser efetuada com segurança aos 30 dias após a inoculação. Para facilitar o serviço, a coleta das plantas é efetuada através de jatos de água na areia, mantendo-se os vasos em posição invertida, sobre o tambor perfurado, de forma a permitir o reaproveitamento da areia.

Lavagem da Areia:

A areia a ser usada nos vasos de Leonard deve estar isenta de nitrogênio ou de qualquer elemento que possa causar toxidez às plantas. Toxidez de manganês já foi observada em areias de diversas procedências. É conveniente, portanto, que se efetue uma lavagem com ácido clorídrico. Preliminarmente, a areia deve ser lavada com água corrente até que esta saia límpida. Faz-se a seguir lavagem com HCl a 5%, durante cerca de cinco horas, com agitação ocasional. Lava-se a seguir com água até completa eliminação do excesso de ácido. A areia lavada e seca pode ser armazenada em sacos plásticos, para uso oportuno.

Condições de Cultivo:

O cultivo de plantas em vasos de Leonard normalmente é efetuado em casa de vegetação. Deve ser lembrado que o processo de nodulação é prejudicado por temperaturas elevadas (acima de 28-30°C nos vasos), sendo portanto, necessário que a casa de vegetação disponha de condicionadores de ar. A pintura dos seus vidros com tinta branca, permite suficiente luminosidade e atenua o problema da temperatura elevada.

A limpeza de casa de vegetação é crucial para o sucesso. Não se deve manter vasos com solo nem permitir a circulação de pessoas não envolvidas no trabalho. Providências devem ser tomadas para evitar que pingos de água de chuva (como normalmente ocorre em casa de vegetação) atinjam os vasos em teste, com a colocação de tetos plásticos, sobre suas bancadas.

2.2.4 Cálculo do número de Rhizobium

Uma vez decorrido o prazo para formação de nódulos, no sistema de cultivo em tubos ou vasos, verifica-se o número de unidades com resultado positivo de nodulação. Entra-se então com o número de unidades noduladas na tabela 1 do anexo, na coluna de duplicatas ou quadruplicatas, conforme o número de repetições escolhido, para obtenção no NMP de Rhizobium na alíquota da menor diluição.

O número de Rhizobium por grama de inoculante é calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Número de Rhizobium/g} = \frac{M \times D}{V \times G}$$

onde:

M = NMP da tabela.

D = menor diluição da série empregada.

V = volume (ml) da alíquota inoculada.

G = peso (g) do inoculante na diluição inicial.

O inoculante será considerado fora do padrão (deficiente) se uma das contagens for inferior a 10×10^6 bactérias/g, mesmo que a média seja superior a esse mínimo.

3. MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES

Para a verificação da estirpe usada no inoculante, a técnica recomendada, por ser a mais simples e de fácil execução, é a tipificação sorológica por aglutinação, descrita por Vincent (1970). A possibilidade de caracterização rápida das estirpes dos nódulos baseia-se no fato de que uma suspensão de bacteróides dos nódulos, que seria o antígeno, aglutina especificamente com o anti-soro da estirpe que deu origem ao nódulo.

O laboratório de controle deverá dispor das estirpes de *Rhizobium* recomendadas para a fabricação de inoculantes.

Preparo do Antígeno

O anti-soro será conseguido pela inoculação de cultura pura da estirpe (antígeno) em coelhos.

A estirpe para a qual se deseja produzir o anti-soro é transferida para um tubo com meio indicado no item 2.1.1, inclinado, substituindo-se o indicador vermelho-congo pelo bromotimol azul, (5 ml/litro de solução alcoólica 0,5%). Quando a cultura atingir um bom crescimento, adicionar 10-12 ml de soro fisiológico (solução de NaCl, 0,85% em água destilada), esterilizado, raspar o crescimento assepticamente, tomando cuidado para não ferir o meio. A suspensão de rizóbios deve estar comprovadamente pura.

Obtenção do anti-soro:

A injeção é feita na veia grande da periferia da orelha do coelho, usando-se seringa e agulha esterilizadas. Injetam-se doses crescentes da suspensão de bactérias, sendo 1 ml no primeiro dia, 2 ml no segundo, 3 ml no terceiro e 4 ml no quarto dia.

Aos sete-dez dias após a última injeção, tira-se uma amostra de sangue de coelho e verifica-se o título do soro. O soro pode ser obtido por centrifugação ou incubação do sangue a 28-30°C por uma hora e repouso em geladeira até separação do plasma e soro. Este pode ser usado imediatamente ou conservado para uso posterior.

Verificação do Título

A verificação do título consiste em fazer reagir diluições sucessivas do antisoro com o antígeno homólogo. O esquema das diluições para a determinação do título pode ser observado na figura 2. Os tubos são colocados em estantes e levados para banho-maria a 52°C por cinco horas. O título do soro é dado pela maior diluição em que a reação de aglutinação se verificou. O coelho será sangrado se o título do soro for superior a 1:3200. Se for inferior, reinocula-se o coelho, observando-se um período de dois dias para recuperação do animal. Há casos que o título desejado não é alcançado, devendo-se descartar o coelho. A coleta de sangue é normalmente feita por punção cardíaca.

Conservação de Soro:

Para conservação, o soro deve ser misturado com quantidade rigorosamente idêntica de glicerina (anticongelante) e guardado no congelador até o momento de uso.

Caracterização das Estirpes dos Nódulos:

Suspensões de bacteróides dos nódulos serão usadas como antígenos. Esses nódulos serão obtidos de plantas cultivadas assepticamente em vasos de Leonard, inoculados com a amostra a ser controlada. A técnica de cultivo asséptico está descrita no item 2.2.3.2. Colhem-se dez nódulos ao acaso, por amostra, lavando-os com água esterilizada. Os nódulos obtidos nas plantas usadas para fazer a contagem no número mais provável, poderão eventualmente ser usados como antígeno. Para isso, depois de verificada a formação dos nódulos, esse material deverá ser mantido, até que os nódulos atinjam um tamanho suficiente para reação de aglutinação. Podem ser usados nódulos frescos ou secos (60-65°C), que são colocados individualmente em tubos de ensaio, com 4 ml de soro fisiológico, e esmagados. Deve-se evitar a contaminação da suspensão de um tubo com a de outro, pois os nódulos poderão ser de estirpes

diferentes. No caso de nódulos secos, esmagá-los depois que estejam túrgidos. A suspensão de nódulos é aquecida a 100°C e pipetada para os tubos de reação, sem fragmentos de nódulos. O esquema das diluições para a caracterização dos nódulos está na figura 3. Notar que a figura considera como ponto de partida o soro diluído 1: 1 em glicerina, tomando, portanto, na primeira alíquota 0,4 ml de soro. Feitas as diluições, os tubos são colocados nas estantes e levados para banho-maria a 52°C por cinco horas. Quando o número de nódulos for muito grande, pode-se deixar em uma sala com temperatura aproximadamente de 28°C por 24 horas. É raro, mas acontece às vezes, a auto-aglutinação. A bactéria fica tão sensível que aglutina em presença de um eletrólito, no caso o soro fisiológico contendo NaCl. A aglutinação vai ser observada em todas as diluições e até mesmo, na testemunha.

TABELA 1
TABELA PARA O CÁLCULO DO Nº MAIS PROVÁVEL DE RHIZOBIUM

Número de unidades positivas (com nódulos), quando testadas em		Número mais provável na alíquota de menor diluição (M)
Duplicata	Quadruplicata	
8	16 15	700 700
7	14 13	690 340
6	12 11	180 100
5	10 9	59 31
4	8 7	17 10
3	6 5	5,8 3,1
2	4 3	1,7 1,0
1	2	0,58
0	1 0	0,5

$$\text{MMP de Rhizobium/g} = \frac{M \times D}{V \times G}$$

M= NMP da tabela

D = menor diluição da série empregada

V= volume (ml) da alíquota inoculada

G= peso (g) do inoculante na diluição inicial

Fatores para limites de confiança (95%)

Duplicatas= 6 e Quadruplicata= 3,5

FIGURA 1- ESQUEMA DAS DILUIÇÕES PARA CONTAGEM DE RHIZOBIUM PELA INOCULAÇÃO EM PLACAS E NÚMERO MAIS PROVÁVEL

FIGURA 2- ESQUEMA DAS DILUIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO ANTI-SORO

FIGURA 3- ESQUEMA DAS DILUIÇÕES PARA CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DOS NÓDULOS