

DETERMINAÇÃO DE COBALTO EM PLANTAS PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE 2-NITROSO-1-NAFTOL (1). PEDRO ROBERTO FURLANI e JOSÉ ROMANO GALLO (2). O cobalto, como componente da vitamina B₁₂, desempenha importante papel na nutrição animal (3). Sua essencialidade às plantas superiores ainda não foi demonstrada muito embora seja exigido pela associação *Rhizobium* — leguminosa na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (4).

A concentração média de cobalto em materiais vegetais é baixa, situando-se ao redor de 0,1 a 0,2 ppm, requerendo por isso métodos de análise bastante sensíveis.

Dentre os reativos colorimétricos recomendados para a sua dosagem, destacam-se o nitroso-R e o 2-nitroso-1-naftol (5). O método baseado na reação entre o cobalto e o reativo 2-nitroso-1-naftol tem mostrado maior viabilidade de uso, uma vez que o complexo colorido obtido pode ser

extraído e concentrado em solvente orgânico, acarretando aumento de sensibilidade. O citado reativo tem sido usado na análise de cobalto em diversos materiais como rochas e solos (6), fertilizantes (7), ferro e aço (8) e em plantas (9).

Visando elucidar alguns aspectos relacionados com as condições de funcionamento do método em questão, foram efetuados no presente trabalho os seguintes estudos: escolha do comprimento de onda para as leituras, efeito do pH na formação do composto colorido, estabilidade do complexo, influência do íon manganoso, amplitude de concentração, precisão e exatidão do método quando empregado na dosagem do elemento em amostras de diferentes materiais vegetais.

Material e métodos: O material constituiu-se de sete amostras de diferentes plantas e todas as determinações foram feitas com três repetições.

Foram utilizados os seguintes reativos e soluções: Solução de

(1) Pesquisa realizada com auxílio do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico, Fundepro-42. Trabalho apresentado na XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em São Paulo — SP, de 2 a 8 de julho de 1972. Recebido para publicação em 8 de maio de 1977.

(2) Com bolsas de suplementação do C.N.Pq.

(3) MAYNARD, A. M. & LOOSLI, J. K. Nutrição animal. Rio de Janeiro, Livraria Freitas Bastos S.A., 1966. 550 p.

(4) VANSELOW, A. P. Cobalt. In: H. D. Chapman, Ed. Diagnostic Criteria for Plants and Soils. University of California. Division of Agricultural Sciences, 1966, p. 142-156.

(5) SANDELL, E. B. Colorimetric determination of traces of Metals. 3rd Ed.. Interscience, New York, 1959.

(6) CLARK, L. J. Cobalt determination in soils and rocks with 2-nitroso-1-naphthol. Anal. Chem. 30:1153-1156, 1958.

(7) HOGSON, J. F. & LAZAR, V. A. Cobalt determination in fertilizers by 2-nitroso-1-naphthol method. Journal of the A. O. A. C. 48:412-415, 1965.

(8) NEEDLEMAN, N. Spectrophotometric determination of cobalt in iron and steel by 2-nitroso-1-naphthol method. Anal. Chem. 38:915-917, 1966.

(9) SSEKAALO, H. The use of 2-nitroso-1-naphthol as an extraction and spectrophotometric reagent for cobalt in plant materials. Anal. Chim. Acta 51:503-508, 1970.

citrato tribásico de sódio a 12,5% em trietanolamina a 20%, NaOH 1 N, HCl 6 N (destilado), HCl 1 N, solução alcoólica de fenolftaleína a 1%, NH_4OH (28-30% de NH_3), acetato de isoamila e solução de 2-nitroso-1-naftol a 0,1%. Para este último dissolveu-se 0,1 g do reativo em 1 ml de solução de NaOH 1 N e em seguida completou-se o volume a 100 ml com água desmineralizada. A solução obtida foi filtrada através de uma mecha de algodão e armazenada em frasco escuro.

Solução-padrão — “estoque” de cobalto — Dissolveram-se 0,4037 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água desmineralizada contendo 1 ml de HCl 6 N e completou-se o volume a 1000 ml com água desmineralizada. Esta solução contém 100 μg de Co/ml.

Soluções-padrão “de uso” de cobalto — Preparadas por diluição da solução — “estoque” de cobalto e contendo 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 10 μg Co/ml.

Procedimento — Transferiram-se 5,0 g da amostra seca e moída para cápsula de porcelana e incinerou-se a 500-550°C durante 3 horas. Após esfriar, as cinzas foram umedecidas com água desmineralizada, tratadas com 5 ml de HCl 6 N e aquecidas em banho de vapor até secagem. Em seguida, o resíduo foi dissolvido com 5 ml de solução de HCl 1 N e a solução obtida foi transferida para funil de separação de 125 ml, através de papel de filtro Whatman n.º 41, lavando-se a cápsula e o papel de filtro com três porções de 10 ml de água des-

mineralizada. Foram adicionados 10 ml de solução de citrato-trietanolamina, duas gotas de solução de fenolftaleína e hidróxido de amônio, gota a gota, até aparecimento de uma leve coloração rósea. Em seguida, adicionou-se 1 ml do reativo 2-nitroso-1-naftol, homogeneizou-se e juntaram-se 4 ml de acetato de isoamila. Os funis foram agitados vigorosamente por um minuto, esperou-se a separação das fases e drenou-se a fase aquosa. A fase orgânica foram adicionadas 5 ml de solução de HCl 1 N, procedeu-se à agitação dos funis por 20 segundos e após a separação das fases, drenou-se a fase aquosa. A seguir, lavou-se a fase orgânica com 5 ml de solução de NaOH 1 N, repetindo-se esta operação até total eliminação da coloração amarela devida ao excesso de reativo. A fase orgânica após ter sido lavada com solução de HCl 1 N foi recolhida em cubetas do espectrofotômetro Beckman modelo DU-2 e as leituras das absorvâncias foram efetuadas a 362 nm, contra uma prova em branco.

As leituras obtidas foram relacionadas com as concentrações de cobalto através de uma curva-padrão, previamente determinada com as concentrações de cobalto variáveis de 0,0 a 4,0 microgramas por 4 ml de solvente.

Resultados e discussão: a) Formação e características do composto colorido. A reação entre o cobalto e o reativo 2-nitroso-1-naftol ocorre numa ampla faixa de valores de pH, sendo lenta entre pH 2,5 e 5 (5) e imediata

entre pH 4 e 9 (10). O procedimento adotado por Clark (6) para a análise em rochas e solos utiliza pH ao redor de 8,5, enquanto o adotado por Ssekaalo (9) para a dosagem do elemento em plantas, emprega pH situado entre 3 e 4.

Em vista dessas discordâncias na recomendação de valores de pH para a reação foi efetuado um estudo visando elucidar esse problema. Os dados obtidos, constantes na figura 1, mostram que

no intervalo de pH 8 e 8,5 ocorreu a máxima formação do composto colorido.

Através dos dados constantes nos quadros 1 e 2, pode-se verificar que a velocidade de reação entre o cobalto e o reativo 2-nitroso-1-naftol é imediata na faixa de pH preestabelecida e que o composto colorido formado permanece estável até 48 horas após sua extração com acetato de isoamila.

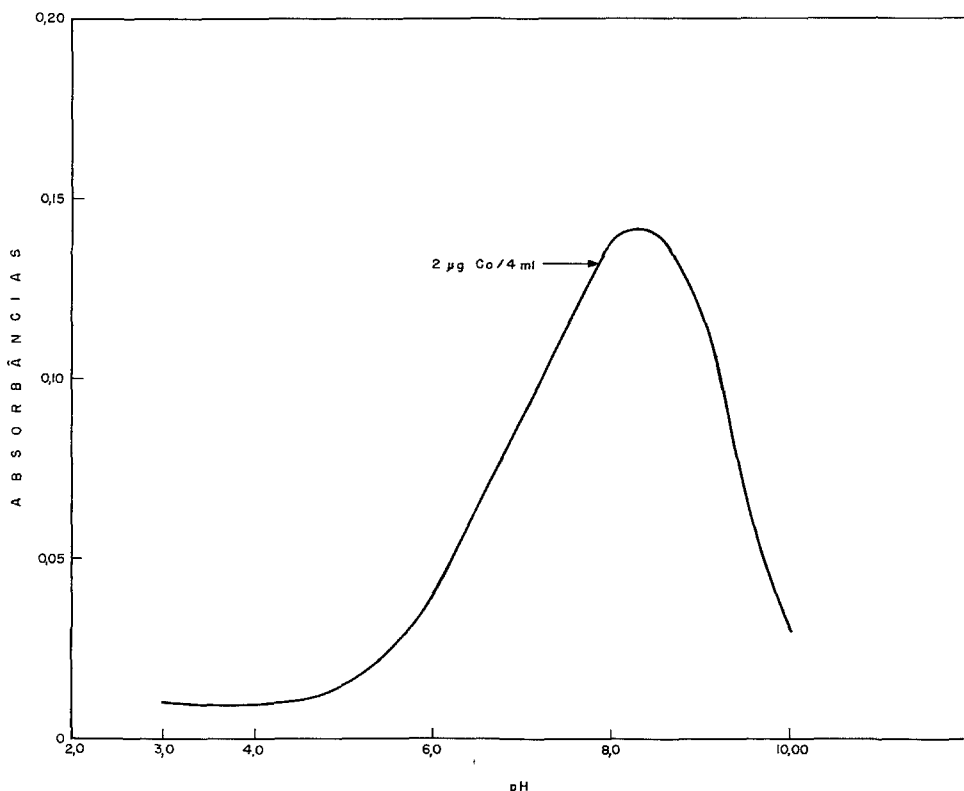


Figura 1. - Variação da absorvância do complexo cobalto-2-nitroso-1-naftolato em função do pH.

QUADRO 1. — Variação da absorbância do cobalto 2-nitroso-1-naftolato em função do tempo de contato dos reagentes, para 2 microgramas de cobalto

Intervalo em minutos antes da extração	Absorbâncias contra prova em branco
0	0,37
5	0,36
15	0,37
30	0,37
60	0,37

QUADRO 2. — Variação da absorbância do 2-nitroso-1-naftolato de cobalto em função do tempo. As leituras foram efetuadas em cubetas fechadas

Microgramas de cobalto	Intervalo em horas após a extração					
	0	1	2	15	24	48
	Absorbâncias contra prova em branco					
1,0	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
1,5	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
2,0	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,38

As recomendações do comprimento de onda para efetuar as leituras das absorbâncias variam bastante de autor para autor. Alguns recomendam a utilização de 530 nm^(5, 6, 10), enquanto outros afirmam que entre 360 e 370 nm, a sensibilidade do

método é triplicada^(8, 9, 11). Conforme se observa na figura 2, a melhor faixa para as leituras situa-se ao redor de 362 nm, estando de acordo com os dados obtidos por Ssekaalo⁽⁹⁾ e por Tran-Van-Dahn e outros⁽¹¹⁾.

⁽¹⁰⁾ BOYLAND, E. Separation of the cobalt complex of 2-nitroso-1-naphthol from other colored metallic complexes. *Analyst* 71:230-231, 1946.

⁽¹¹⁾ TRAN-VAN-DAHN; SPITZ, J. S. & MATHIEN, C. La dosage espectrophotométrique du cobalt dans le fer de très haute pureté. *Anal. Chim. Acta* 36:204-209, 1966.

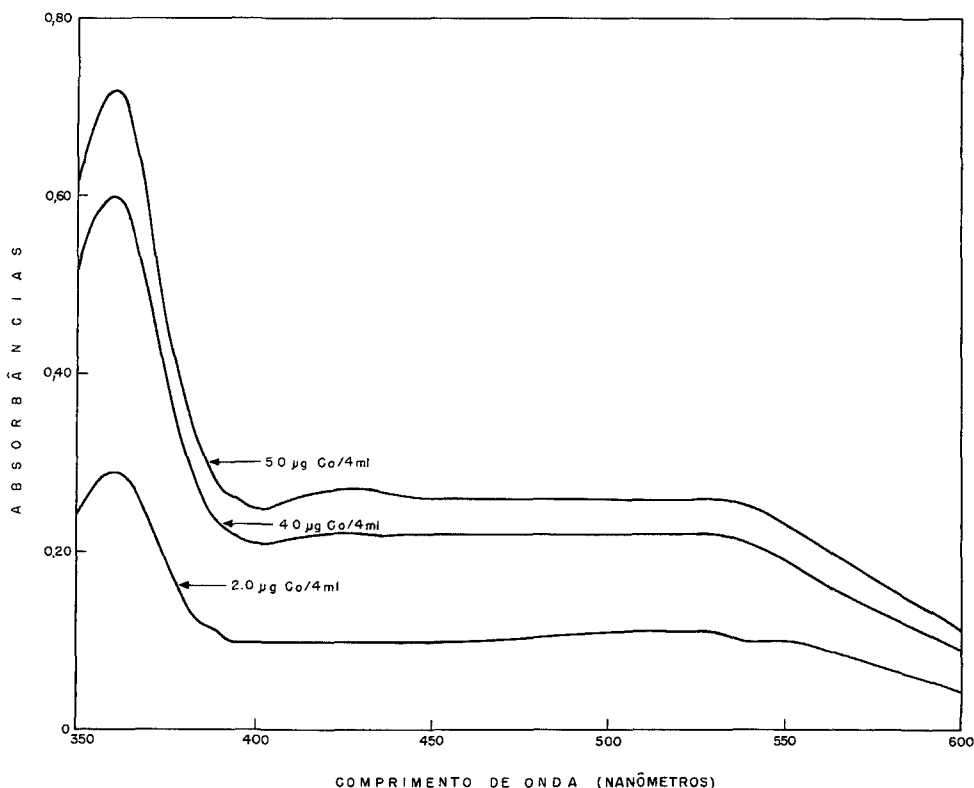


Figura 2. - Espectros de absorção do cobalto-2-nitroso-1-naftolato.

Uma vez definidos o pH para a reação e o comprimento de onda para as leituras, procurou-se determinar a melhor amplitude de concentração de cobalto na qual o erro fotométrico é mínimo. Conforme se observa pela análise da figura 3 e do quadro 3, a faixa de concentração de cobalto, correspondente a um erro fotométrico mínimo, situa-se entre 0,5 e 5,0 microgramas de Co/4 ml de solvente. Nas condições estudadas, a absorvidade molar do complexo cobalto-2-nitroso-1-naftolato equivale a $3,3 \times 10^{-4}$.

b) Interferentes — Dentre os elementos presentes no extrato clorídrico de cinza de material vegetal, os nutrientes cobre, ferro e manganês podem interferir seriamente na formação do composto colorido.

As interferências devidas ao cobre e ao ferro são facilmente contornadas mediante lavagem com HCl 1 N e complexação com citrato, respectivamente (6).

A ação do íon manganoso ocorre de forma a inibir a formação do complexo cobalto-2-nitroso

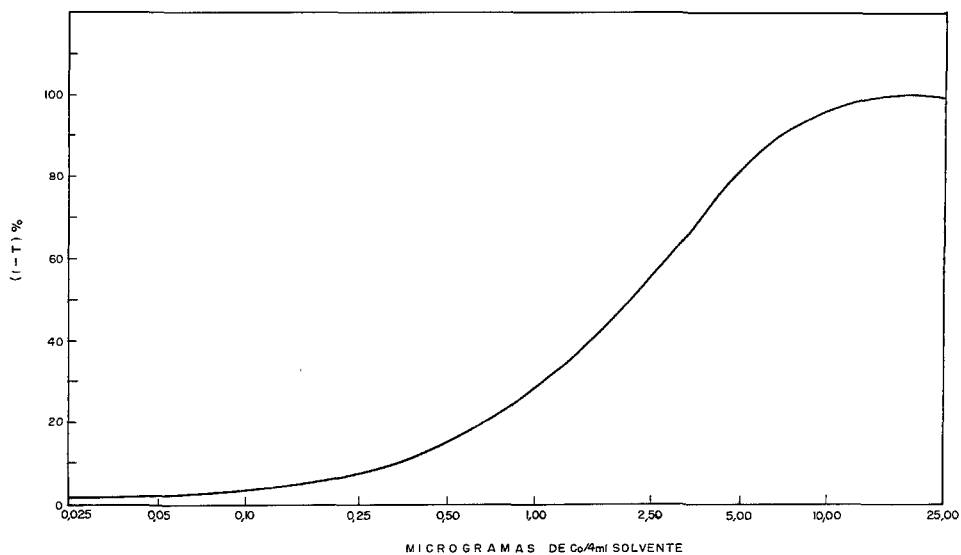


Figura 3. - Curva de Ringbon, obtida para o complexo cobalto-2-nitroso-1-naftolato.

QUADRO 3. — Variação do erro relativo de concentração, quando se considera o erro fotométrico absoluto de 1%, para diferentes amplitudes de concentração e no comprimento de onda de 362 manômetros

Amplitude de concentração de cobalto (μg de Co/4ml)	Erro relativo de concentração em função do erro fotométrico absoluto de 1%
0,05 — 0,50	17,69
0,10 — 1,00	9,20
0,25 — 2,50	4,74
0,25 — 5,00	4,01
0,50 — 2,50	3,92
0,50 — 5,00	3,43
1,00 — 10,00	3,43
2,50 — 10,00	3,43
2,50 — 25,00	6,86
5,00 — 25,00	9,20

-1-naftolato. Dentre os complexantes utilizados por diversos autores na complexação do manganês, merecem citação o tiosulfato de sódio (6) e a trietanolamina (12).

Os dados constantes no quadro 4 mostram que a interferência de até 1000 microgramas de

manganês pode ser eliminada com 1 ml de solução de tiosulfato de sódio a 10%, ao passo que a presença de até 5000 microgramas de Mn pode ser contornada com 2 ml de trietanolamina a 80%. Para facilitar as operações práticas do método, a solução de trietanolamina foi juntada à solução de citrato.

QUADRO 4. — Influência de quantidades variáveis do íon manganoso sobre a absorvância de 1 micrograma de cobalto e a eliminação da interferência

Mn ²⁺ presente	Na ₂ S ₂ O ₃ a 10%	Trietanolamina a 80%	Absorvância
µg	ml	ml	
0	0	0	0,13
1000	0	0	0,12
5000	0	0	0,08
1000	1	0	0,13
5000	1	0	0,12
1000	2	0	0,13
5000	2	0	0,12
1000	0	1	0,12
5000	0	1	0,11
5000	0	1,5	0,13
5000	0	2	0,13
5000	0	2,5	0,13

c) Precisão e exatidão do método na análise de material vegetal — Preliminarmente ao desenvolvimento deste estudo, fez-se uma avaliação dos teores de cobalto obtidos por duas diferentes técnicas de preparo de extrato: via seca e via úmida. O procedimento

adotado para o preparo do extrato por via seca já foi descrito neste trabalho, enquanto para o por via úmida adotou-se técnica convencional.

Os dados obtidos, constantes no quadro 5, revelam que as duas técnicas de preparo de extrato se

(12) BERGAMIN, H. O método colorimétrico do Tiazol Amarelo na determinação do magnésio. Tese apresentada à E. S. A. "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de Doutor em Agronomia, 1961, 56 p. (mimeografado).

equivalem, devendo, entretanto, optar pela que emprega a via seca, principalmente por ser mais rápida e simples.

O estudo da precisão foi efetuado determinando-se o teor de cobalto em diversos vegetais, com três repetições. Os resultados acham-se no quadro 6. Pelo exame dos desvios padrões das

médias e dos coeficientes de variação apresentados no referido quadro e considerando que o coeficiente de variação médio para os dez vegetais é de 3,75%, conclui-se que a precisão do método é satisfatória.

A exatidão do método foi avaliada através de um ensaio de recuperação, trabalhando com as

QUADRO 5. — Comparação entre métodos de preparo da solução da amostra. Concentração de Co, em partes por milhão sobre matéria seca

Material vegetal (folhas)	Via seca	Via úmida
	ppm	ppm
Amendoim	0,43	0,43
Batata	1,32	1,43
Soja	0,57	0,57
Tomate	1,07	1,07

QUADRO 6. — Precisão da determinação e recuperação de cobalto em amostras de diferentes materiais vegetais (2)

Material vegetal	Peso da amostra	Cobalto na amostra Médias \pm erro padrão	Coeficiente de variação	Quantidade de cobalto		Recuperação
				Adicionada	Determinada	
	g	μE	%	μE	μE	%
Amendoim (folhas)	2,0	0,608 \pm 0,011	1,81	0,500	1,118	100,9
Cana-de-açúcar (folhas)	5,0	0,294 \pm 0,018	6,12	0,500	0,785	98,9
Soja (folhas)	1,0	0,443 \pm 0,016	3,61	0,500	0,931	98,7
Mandioca (folhas)	5,0	0,426 \pm 0,015	3,52	0,500	0,944	101,9
Café (folhas)	5,0	0,900 \pm 0,021	2,33	0,500	1,352	96,6
Batata (folhas)	1,0	1,081 \pm 0,000	0,00	0,500	1,526	96,5
Tomate (folhas)	5,0	3,439 \pm 0,122	3,55	0,500	3,739	94,5
Capim-pangola (parte aérea)	3,0	0,340 \pm 0,021	6,18	1,000	1,311	97,8
Capim-colonião (parte aérea)	3,0	0,326 \pm 0,018	5,52	1,000	1,264	95,3
Stylozanthés (parte aérea)	2,0	1,725 \pm 0,083	4,81	1,000	2,656	97,5

(2) Os resultados representam as médias de três repetições.

mesmas amostras usadas no estudo da precisão. Adicionou-se uma quantidade conhecida de solução-padrão de cobalto ao extrato clorídrico e os dados obtidos, com três repetições, encontram-se também no quadro 6.

Portanto, em vista dos resultados obtidos, pode-se considerar que o método apresenta razoável exatidão quando aplicado na determinação de cobalto em plantas.

Conclusões: Com base nos dados obtidos pode-se concluir que:

a) Na faixa de pH entre 7 e 8,5 a formação do complexo é imediata e o mesmo permanece estável por um período mínimo de 48 horas.

b) O comprimento de onda mais adequado para as leituras

das absorvâncias situa-se entre 360 e 365 manômetros.

c) Obteve-se maior exatidão nas determinações no intervalo de 0,5 a 5 microgramas de cobalto por 4 ml de acetato de isoamila.

d) A interferência de até 5 miligramas de Mn pode ser contornada mediante emprego de solução de trietanolamina como agente complexante.

e) A precisão e a exatidão, definidas respectivamente por um coeficiente de variação médio de 3,7% e uma porcentagem média de recuperação de 97,9%, possibilitam a utilização do método do 2-nitroso-1-naftol na determinação do cobalto em materiais vegetais.

SEÇÃO DE QUÍMICA ANALÍTICA,
INSTITUTO AGRÔNOMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

DETERMINATION OF COBALT IN PLANTS BY THE 2-NITROSO-1-NAPHTHOL METHOD

SUMMARY

A spectrophotometric method for the cobalt determination in plant material was studied, using 2-nitroso-1-naphthol.

Immediate formation of a stable complex is obtained when the reaction is conducted at pH between 7.0 and 8.5.

The procedure involves adding triethanolamine solution in order to eliminate manganese interference, and after extraction in an organic phase, the absorbance of the complex is measured at 360-365 nm.

The 2-nitroso-1-naphthol method was suitable to determine cobalt in the range of 0.5-5.0 microgram per 4 ml of isoamylacetate, as organic solvent. The accuracy was evaluated by the coefficient of variation (about 3.75%) and by the recovery of cobalt added to the extracts of plant materials (about 97.9%).