

EDILANE ALICE DE ALCÂNTARA ASSUNÇÃO

**ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM
ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA POR
ESPECTROFOTOMETRIA COM AZUL DE MOLIBDÊNIO**

RECIFE

Pernambuco – Brasil

Julho – 2019

EDILANE ALICE DE ALCÂNTARA ASSUNÇÃO

**ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM
ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA POR
ESPECTROFOTOMETRIA COM AZUL DE MOLIBDÊNIO**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Freire – DEPA/UFRPE

RECIFE

Pernambuco – Brasil

Julho – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A851e Assunção, Edilane Alice de Alcântara
Estudo do efeito de matriz na determinação de fósforo em espécies arbóreas de floresta tropical seca por espectrofotometria com azul de molibdênio / Edilane Alice de Alcântara Assunção. - 2019.
44 f. : il.
- Orientador: Fernando Jose Freire.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Química, Recife, 2020.
1. Adição-padrão. 2. Diluição de matriz. 3. Efeito de matriz. 4. Espectrofotometria no visível . 5. Fósforo. I. Freire, Fernando Jose, orient. II. Título

EDILANE ALICE DE ALCÂNTARA ASSUNÇÃO

**ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM
ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA POR
ESPECTROFOTOMETRIA COM AZUL DE MOLIBDÊNIO**

APROVADA em ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Levy Paes Barreto
Departamento de Química - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Alex Souza Moraes
Departamento de Química – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Orientador:

Prof. Dr. Fernando José Freire
Departamento de Agronomia – Universidade Federal Rural de Pernambuco

RECIFE

Pernambuco – Brasil

Julho – 2019

A minha família. Minha avó, Severina Maria de Alcântara (*in memoriam*) Mãe, Edijinan Maria de Alcântara. Tia, Edijane Maria de Alcântara. Pelo apoio, preocupação e incentivo que sempre demonstraram durante toda a minha vida acadêmica. Compartilhando momentos de luta, glórias, angústias, ausência. por terem me acompanhado desde sempre me instruindo, torcendo e auxiliando sempre que foi preciso.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus – único, eterno, imutável, imaterial, onipotente, soberanamente justo e bom, infinito em todas as perfeições. A Ele pela oportunidade e privilégio de concluir mais um ciclo profissional.

A todos os membros da minha família, em especial Tiago Marcos pelo apoio durante toda minha formação acadêmica.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo amparo, por toda a experiência de vida e crescimento profissional proporcionados durante a Graduação.

A João Bosco, pela paciência, companheirismo, grande incentivo e estímulo a nunca desistir. Por tornar essa jornada menos pesada e me contemplar com tantos momentos de alegria.

Aos meus amigos, em especial, Thaynara Evelyn e Sabrina Sousa pelos momentos de amizade, confidências, conselhos e companheirismo ao longo dos anos, principalmente ao incentivo durante a formação acadêmica.

A Dayane Thais e Karla Cristina pelos momentos agradáveis de convivência durante a formação acadêmica.

A Rayanne Gomes pela grande colaboração e auxílio nas análises laboratoriais, fundamental a execução dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Fernando José Freire, pela confiança e orientação durante minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Química do Solo, localizado no departamento de agronomia – UFRPE, coordenado pela Prof^a. Maria Betânia dos Santos Galvão Freire, exemplo de profissionalismo. À todos que por lá passaram, da graduação a pós. Em especial, à Danubia Lima pelo acolhimento.

A Clarissa Freire e Weydson Cavalcante pelo auxílio nos recursos materiais que subsidiaram a pesquisa.

À Pedro Gabriel C. de Lucena por ser mais que um técnico de laboratório. Por sua incrível perseverança de crescimento profissional, dedicação à Química e ao Laboratório de Química do Solo. Pela ajuda irrestrita as análises laboratoriais e orientação.

Ao Cenapesq da UFRPE pela orientação, concessão do uso de equipamentos e vidrarias. Principalmente ao seu diretor, o prof. Dr. Carlos Guaraná e aos técnico-administrativos, Marcelo Andrade e José Júlio Ferreira Júnior.

Aos professores, doutores, mestres e funcionários que direta ou indiretamente e outras pessoas aqui não mencionadas que contribuíram para realização desta obra.

Muito obrigada!

RESUMO

Os solos de floresta tropical seca apresentam uma escassez em fósforo. Esse nutriente após a absorção pelas plantas, é devolvido novamente ao solo pelo processo de ciclagem de nutrientes, processo ecossistêmico essencial à conservação de ecossistemas florestais. Assim, a análise de material foliar e o estado nutricional das folhas são importantes pois possibilitam compreender a dinâmica e a manutenção dos ecossistemas florestais. O método espectrofotométrico no visível com azul de molibdênio destaca-se na determinação de fósforo, principalmente pelo seu nível de sensibilidade. No entanto, o efeito de matriz durante as análises pode comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos. Face ao exposto, essa pesquisa objetivou avaliar o efeito de matriz na determinação de fósforo em espécies arbóreas de floresta tropical seca por espectrofotometria com Azul de Molibdênio. O estudo contemplou as duas espécies de maior representatividade no ambiente florestal em Araripina, Pernambuco, nos períodos seco e úmido. A digestão do material vegetal foi realizada com ácido sulfúrico 98% e peróxido de hidrogênio 30%, na presença de catalisadores. A determinação foi feita por espectrofotometria com azul de molibdênio, associados a adição-padrão e cinco proporções de diluição da matriz. Os dados apontaram uma diminuição da absorbância resultante do efeito de matriz e consequentemente do teor de P quantificado. O pH do extrato vegetal também afetou na determinação analítica do fósforo, contudo, de forma menos significativa que o efeito de matriz. As amostras submetidas a diluição de matriz e adição-padrão apresentaram uma recuperação de fósforo mais eficiente. As espécies *Croton Limae* e *Guapira opposita* apresentaram maiores teores de fósforo no período úmido, devido influência da precipitação pluviométrica. Sendo a *Guapira Opposita* a espécie que apresentou maior teor de P, nos dois períodos de avaliação, e a que sofreu menor influência do efeito de matriz. Assim, o efeito de matriz influencia a quantificação de fósforo pelo método azul de molibdênio, principalmente em espécies com baixo teor de P. Esse efeito pode ser minimizado com o emprego de diluição de matriz combinada com adição-padrão.

Palavras-chave: diluição de matriz, efeito de matriz, espectrofotometria no visível, fósforo.

ABSTRACT

Dry tropical forest soils have a shortage of phosphorus. This nutrient after absorption by plants, is returned to the soil by the nutrient cycling process, an ecosystem process essential for the conservation of forest ecosystems. Thus, the analysis of leaf material and the nutritional status of leaves are important because they allow understanding the dynamics and maintenance of forest ecosystems. The visible spectrophotometric method with molybdenum blue stands out in the determination of phosphorus, mainly due to its level of sensitivity. However, the matrix effect during analysis may compromise the reliability of the results obtained. Given the above, this research aimed to evaluate the effect of matrix on the determination of phosphorus in tree species of dry tropical forest by spectrophotometry with Molybdenum Blue. The study included the two most representative species in the forest environment in Araripina, Pernambuco, in the dry and wet periods. Digestion of the plant material was performed with 98% sulfuric acid and 30% hydrogen peroxide in the presence of catalysts. The determination was made by molybdenum blue spectrophotometry, associated with standard addition and five matrix dilution ratios. The data showed a decrease in absorbance resulting from the matrix effect and consequently the quantified P content. The pH of the plant extract also affected the analytical determination of phosphorus, however, less significantly than the matrix effect. Samples submitted to matrix dilution and standard addition showed a more efficient phosphorus recovery. The species *Croton Limae* and *Guapira Opposita* presented higher phosphorus contents in the wet period, due to the influence of rainfall. *Guapira Opposita* was the species with the highest P content in both evaluation periods, and the one with the lowest influence of the matrix effect. Thus, the matrix effect influences the phosphorus quantification by the molybdenum blue method, especially in low P species. This effect can be minimized by using matrix dilution combined with standard addition.

Keywords: matrix dilution, matrix effect, visible spectrophotometry, phosphorus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do componente arbustivo-arbóreo das duas espécies de maior densidade absoluta (DA) em floresta tropical seca em Araripina, Pernambuco.....	25
Tabela 2 - Esboço da quantidade de amostras de espécies arbóreas que foram submetidas a digestão contendo adição-padrão.....	26
Tabela 3 - Caracterização da proporção de diluição os extratos de fósforo.....	27
Tabela 4 - Caracterização da proporção de diluição para as curvas de fósforo por calibração externa e compatibilidade de matriz.	28
Tabela 5 - Absorbância das curvas analíticas de fósforo em solvente puro (água) e em matriz.....	31
Tabela 6 - Absorbância das curvas analíticas de fósforo em solvente puro (água) e em matriz diluída em determinadas proporções.....	33
Tabela 7 - Leitura da média de pH dos extratos de fósforo e nas curvas analíticas de fósforo nas cinco proporção de diluição.....	34
Tabela 8 - Percentual recuperado (%) de fósforo pela adição-padrão nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.....	36
Tabela 9 - Teor de fósforo (g kg^{-1}) nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.....	37
Tabela 10 - Teor de fósforo (g kg^{-1}) por adição-padrão nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 DINÂMICA DO FÓSFORO EM ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA.....	13
2.2 ANÁLISE QUÍMICA DE FÓSFORO EM TECIDO VEGETAL.....	15
2.2.1 Digestão via úmida em material vegetal.....	15
2.2.2 Análise quantitativa de fósforo em material vegetal.....	18
2.3 INFLUÊNCIA DO EFEITO DE MATRIZ EM RESULTADOS ANALITICOS.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 MATERIAL VEGETAL EM ESTUDO.....	24
4.2 DIGESTÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.3 PREPARAÇÃO DE CURVA ANALITICA.....	27
4.4 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO.....	28
4.5 MEDIÇÃO DE pH.....	29
4.6 ANÁLISE DE DADOS E CÁLCULO.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 INTERFERENCIAS NA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	30
5.1.1 Efeito de Matriz.....	30
5.1.2 Efeito do pH.....	33
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO EM ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA, ARARIPINA – PERNAMBUCO.....	35
5.2.1 Dinâmica da recuperação de fósforo em espécies arbóreas.....	35
5.2.2 Teor de fósforo sem adição-padrão.....	37
5.2.3 Teor de fósforo com adição-padrão.....	38
5.2.4 Comparação entre os teores de fósforo sem e com adição-padrão.....	39
6 CONCLUSÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O estudo e a conservação das florestas tropicais secas constituem um grande desafio ao conhecimento científico brasileiro. Essas formações florestais estão entre as de maior biodiversidade, mais devastadas e modificadas pelo homem. As diversas atividades econômicas desenvolvidas no espaço anteriormente ocupado por essas florestas em Pernambuco vêm contribuindo de forma significativa para o desflorestamento, isso porque necessitam de elevada demanda por biomassa vegetal, no caso da região do Araripe, a principal matriz energética do Arranjo Produtivo Local do Polo Gesseiro do Araripe/PE.

Apesar da importância socioeconômica para a região, a exploração inapropriada de áreas de Floresta tropical seca impacta negativamente a biodiversidade e conservação desse domínio. Essas áreas, em grande parte, estão estabelecidas em solos com baixa fertilidade, o que torna o processo de ciclagem de nutrientes importante nesses ambientes (SANTANA, SOUTO, 2011). Os solos de floresta tropical seca apresentam uma escassez recorrente em nutrientes como o fósforo (SAMPAIO et al., 1995).

O fósforo é um macronutriente constituinte do tecido vegetal considerado como essencial, em virtude da sua participação em processos vitais para a planta (MALAVOLTA et al., 1997), como a fotossíntese, respiração e armazenamento de energia. O fósforo quando absorvido pelas plantas é transformado em fosfato orgânico, que irão utilizá-lo para a formação de compostos orgânicos e principalmente na formação de moléculas de ATP. Após a absorção e assimilação do fósforo pelas plantas, esse nutriente é devolvido novamente ao solo pelo processo de produção e decomposição da serapilheira (BOCCUZZI, 2017).

Se comparada com os processos de intemperismo, que consiste na transferência do fósforo contidos em rochas para as plantas na forma de fosfato, a ciclagem de nutrientes da matéria orgânica morta é a maior fonte de nutrientes das florestas. (GOMES et al., 2000). Em ambientes tropicais, a ciclagem de fósforo é tão eficiente que esse elemento está em baixas concentrações na camada superficial e retido na biomassa (FILIPPELL, 2008; VITOUSEK et al. 1997; RUTTENBER, 2003 apud BOCCUZZI, 2017).

O conhecimento do teor desse elemento nas plantas, assim como dos demais elementos, possibilita verificar a ocorrência de deficiências, toxidez ou de desequilíbrio nutricional em seus diferentes níveis (MALAVOLTA et al., 1997). Avaliar os aspectos nutricionais de cada espécie possibilita compreender a dinâmica e a manutenção dos ecossistemas florestais, principalmente em ambientes onde o solo possui um baixo potencial nutricional como é relatado em ambientes tropicais (SOUZA et al., 2012).

Para isso, a análise química quantitativa de tecidos vegetais é um dos métodos utilizados para avaliar o estado nutricional das plantas, pois constitui uma medida direta da disponibilidade de nutrientes no solo, uma vez que os resultados correspondem à quantidade de nutrientes absorvida pelas plantas (MALAVOLTA et al., 1997). Para as determinações dos teores são normalmente realizadas nas folhas, por ser esse o órgão que melhor reflete se a planta está bem nutrida ou não, se há falta ou excesso de nutrientes (NOGUEIRA et al., 2005).

Para a determinação dos teores de fósforo nas plantas, normalmente é necessária a transformação da matriz orgânica original (amostra de tecidos vegetais) em uma forma inorgânica simples (NOGUEIRA et al., 2005). O método tradicional usado é a digestão por via úmida, no qual a matéria do tecido vegetal é oxidada com ácidos minerais concentrados e a quente. A escolha do ácido ou mistura de ácidos depende da natureza da amostra e do método utilizado para a determinação do fósforo (EMBRAPA, 2009).

Após a sua extração, o fósforo pode ser determinado por diversos métodos analíticos, sendo os métodos de espectrofotometria de absorção molecular no visível, mais rápidos do que os métodos gravimétricos e volumétricos, além de apresentarem níveis de sensibilidade muito superiores.

Na escolha do método para determinar o teor de fósforo, assim como o tipo de digestão a ser utilizado para extrair o fósforo do material vegetal, deve ser considerado, entre outros, a natureza do material, a sensibilidade requerida no processo, disponibilidade de equipamentos e segurança em utilizar tal procedimento técnico.

Nessa perspectiva o método espectrofotométrico no visível com azul de molibdênio apresenta-se como uma alternativa viável para determinar o teor de fósforo em plantas de floresta tropical seca. Nesse método o fosfato reage com o molibdato de amônio, em meio fortemente ácido, para formar o complexo fosfomolibdato de amônio, que é reduzido a azul de molibdênio, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de íons fósforo presentes na amostra (MALAVOLTA et al, 1997). E em seguida correlacionada com soluções padrões de fósforo, pois a concentração do analito na amostra é determinada através de uma curva analítica – absorvância x concentração – construída com soluções padrão de fósforo e medida em 660 nm (LEAL et al., 2007).

No entanto, quando aplicada a problemas do mundo real, a qualidade dos resultados do método azul de molibdênio, assim como a qualidade do desempenho das ferramentas e instrumentos usados, precisa ser constantemente avaliada (SKOOG et al., 2008). Nesse sentido, a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises é imprescindível.

Qualquer fonte de erro em potencial deve ser investigada e caracterizada, como o efeito de matriz durante as análises de tecido vegetal. Os efeitos de matriz decorrentes da existência de espécies interferentes na amostra, que não estão presentes nos padrões ou no branco, podem fazer que os analitos e os padrões de igual concentração forneçam respostas diferentes.

Nessa perspectiva, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito matriz na determinação de fósforo em espécies arbóreas de floresta tropical seca por espectrofotometria com Azul de Molibdênio.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DINÂMICA DO FÓSFORO EM ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA

As rochas são o principal reservatório de fósforo na natureza, que o transfere para o solo na forma de fosfato a partir de processos de intemperismo. Diferentemente dos ciclos do nitrogênio, carbono e oxigênio, nos quais envolvem trocas gasosas (GOMES et al., 2000). Segundo Dechen e Nachtigal (2007) as plantas absorvem a maior parte do fósforo na espécie H_2PO_4^- e em menor proporção como HPO_4^{2-} . O pH do solo influi, em grande parte na proporção com que estas duas formas de P estão disponíveis para a absorção das plantas.

O fósforo, após a absorção e assimilação pelas plantas, é devolvido novamente ao solo pelo processo de produção e decomposição da serapilheira. Em ambientes tropicais, a ciclagem de fósforo é tão eficiente que esse elemento está em baixas concentrações na camada superficial e retido na biomassa (FILIPPELL, 2008; VITOUSEK et al. 1997; RUTTENBER, 2003 apud BOCCUZZI, 2017).

Os solos tropicais de acordo com Bonser et al (1996) são caracterizados pelo elevado grau de intemperização e pelos baixos teores de P na forma disponível às plantas. Sampaio et al (1995) apontam uma escassez recorrente em nutrientes como fósforo em solos do semiárido. Segundo Selle (2007) as florestas tropicais secas, em grande parte, estão estabelecidas em solos pobres em nutrientes minerais.

Alves et al. (2017) também relatou teores de P considerado baixos em folhas e os relacionou a baixa disponibilidade desse nutriente em solos de Caatinga. Santos et al. (2015) avaliando solo de floresta seca constataram pouca disponibilidade de P no solo comprovada pelos baixos teores de P apresentados pelas espécies. Raulino (2019) em estudos com espécies arbóreas na floresta tropical seca em Araripina, Pernambuco encontrou baixos teores de P e associou os valores encontrados ao teor desse nutriente no solo considerados baixos.

No tecido vegetal o fósforo é considerado essencial e tem participação em processos vitais para a planta (MALAVOLTA et al, 1997), como a fotossíntese, respiração e armazenamento de energia. Esse nutriente é importante na transferência de energia como parte do trifosfato de adenosina (ATP), como componente de muitas proteínas e coenzimas. Além de promover a rápida formação e crescimento das raízes, melhorando a qualidade dos frutos, hortaliças e grãos (DECHEN; NACHTIGALL, 2007).

O P da planta se encontra em cinco grupos: O DNA e o RNA, ácidos desoxirribonucleico e ribonucleico, são dois deles, polímeros de nucleotídeos; há P-lipídico, ésteres e P inorgânico (MALAVOLTA et al., 1997). O P orgânico (Po) é encontrado na forma de fosfolípides, ácidos nucleicos e fosfatos de inositol. O Po expresso em percentagem do P total, pode variar de 15 a 80%. Na forma de fosfolipídios, as concentrações variam em torno de 5% do Po. O P na forma de ácidos nucleicos pode atingir valores de 2,5 % ((DECHEN; NACHTIGALL, 2007). De acordo com Malavolta et al. (1997) a última fração é construída pelo P inorgânico (Pi), que representa cerca de 15% do P total nos tecidos de uma planta pobre em fósforo até 70% em uma que esteja perto da toxicidade

Segundo Bezerra Neto e Barreto sua concentração total em tecidos vegetais pode variar de 1 a 15g kg⁻¹ da matéria seca. Dechen e Nachtigal (2007) são mais específicos quanto aos teores de fósforo nas plantas, citando Malavolta (1980), Malavolta et al. (1989), Paris&Jones Junior (1996) e Furlani (2004), no qual os teores de P nas plantas variam de 0,5 a 3,0 g kg⁻¹ de matéria seca da planta, considerando-se teores entre 1,0 a 1,5 g kg⁻¹ como adequados para um crescimento normal das plantas. Plantas deficientes apresentam teores foliares menores do que 1,0 g kg⁻¹.

Faquin (2002) estabeleceu níveis críticos para espécies florestais em plantios comerciais para diversos nutrientes, ao qual teores abaixo dessa estreita faixa reduz a produção. Para o fósforo a faixa crítica indica é de 1,67 g kg⁻¹. Freire (2018) avaliando a serapilheira foliar das espécies *Guapira opposita*, *Croton limae*, *Metrodorea mollis*, *Annona leptopetala* e *Pilocarpus spicatus* em floresta seca, encontrou teores médios de 0,86 g kg⁻¹, abaixo dessa faixa crítica.

A decomposição da serapilheira foliar resulta, principalmente, no retorno de nutrientes ao solo. Em ambientes tropicais, a ciclagem de fósforo é tão eficiente que esse elemento está em baixas concentrações na camada superficial e retido na biomassa (FILIPPELL, 2008; VITOUSEK et al. 1997; RUTTENBER, 2003 apud BOCCUZZI, 2017). A serapilheira é o elemento-chave da ciclagem de nutrientes, relacionando vegetação e solo, controla a maioria dos processos que ocorrem no ecossistema florestal.

Toda a dinâmica da serapilheira, desde sua deposição até a decomposição é reflexo do ambiente no qual está inserida. A floresta tropical seca brasileira, renomeada recente pelo IBGE (2012) com o binômio Savana-Estépica (Caatinga), abrange os estados de Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a faixa norte de Minas Gerais. Isso equivale a cerca de 11% do território nacional (MMA,2020). Seu regime de chuvas é sazonal, com padrão de distribuição espacial e temporal altamente variável (GUERREIRO et al., 2013). O déficit hídrico no solo é o principal fator abiótico que limita o desenvolvimento das espécies em locais áridos e semiáridos (DONOHUE et al., 2013).

Freire (2018) verificou irregularidade na distribuição das chuvas ao longo de um mesmo ano, após monitoramento nos últimos 20 da região de floresta tropical seca da região de Araripina, Pernambuco. A partir da média histórica, a autora percebeu quatro períodos: úmido e seco e os de transição úmido-seco e seco-úmido. Sendo o período úmido e seco os mais marcantes ao longo do ano na região, caracterizados por apresentar média histórica acima dos 140,00 mm (janeiro a março) e médias abaixo dos 7,00 mm (junho a outubro) respectivamente.

De acordo com Faquin (2005) em floresta tropical seca, durante a estiagem, os nutrientes estocados no solo não conseguem ser absorvidos pelas plantas devido à redução no conteúdo de água no solo. Com isso, podem ser retranslocados dentro da planta, no ciclo bioquímico, das folhas mais velhas para as mais novas e para as folhas remanescentes (MENGEL; KIRKBY, 1982). No período úmido, o solo passa a exercer maior influência, via ciclo biogeoquímico, fornecendo nutrientes (REIS; BARROS, 1990).

Raulino (2019) encontrou um acréscimo no teor de fósforo na serapilheira de espécies arbóreas de floresta tropical seca no período úmido e sugeriu que variáveis ambientais como as condições climáticas promoveram diferenças entre a quantidade de nutrientes aportada na serapilheira de cada período.

2.2 ANÁLISE QUÍMICA DE FÓSFORO EM TECIDO VEGETAL

2.2.1 Digestão via úmida em material vegetal

As folhas são consideradas o “cerne” das atividades fisiológicas. Local onde ocorrem as principais reações metabólicas, cujas alterações oriundas de distúrbios nutricionais são mais evidentes (MARTIN-PREVEL et al., 1984). Por isso, a análise foliar é uma das técnicas utilizadas para a avaliação do estado nutricional das plantas, o que possibilita verificar a ocorrência de deficiências, toxidez ou de desequilíbrio nutricional, em seus diferentes níveis (MALAVOLTA et al., 1997).

Avaliar os aspectos nutricionais de cada espécie possibilita compreender a dinâmica e a manutenção dos ecossistemas florestais, principalmente em ambientes onde o solo possui um baixo potencial nutricional como é relatado em ambientes tropicais (SOUZA et al., 2012). Carneiro (2001) completa que a análise de tecidos de plantas visa determinar em que condições nutricionais uma planta se encontra, solucionando muitos problemas (por exemplo crescimento), e ajudando a melhor entender os mecanismos fisiológicos que regem o ciclo de vida de um vegetal.

Segundo Nogueira et al. (2005) os fatores mais importantes que devem nortear a escolha dos métodos são: fatores de segurança (periculosidade, toxidez), disponibilidade do equipamento, elemento a ser determinado, precisão e exatidão, tempo necessário para obtenção dos resultados, limites de detecção e determinação, capacitação do analista e custo.

Segundo com Nogueira et al. (2005) para que o teor de fósforo nas plantas seja quantificado, é necessário a transformação da matriz orgânica original (amostra de tecidos vegetais) em uma forma inorgânica simples. Malavolta et al. (1997) define essa etapa como a fase da retirada dos elementos de compostos orgânicos. De acordo com Silva et al (2010) o fósforo se apresenta em diferentes formas químicas, fósforo orgânico (combinado com a matéria orgânica) e fósforo inorgânico e para a sua determinação é necessário que todo o fósforo presente no material vegetal veja convertido na forma de ortofosfato.

A decomposição da matéria orgânica pode ser realizada por um dos seguintes métodos: via seca e via úmida. A primeira baseia-se na queima da fração orgânica da amostra, obtendo-se resíduo inorgânico na forma de cinza solúvel em solução diluída de ácido ou de base (NOGUEIRA et al., 2005). O segundo método é o tradicionalmente usado, via úmida, no qual a matéria do tecido vegetal é oxidada com ácidos minerais concentrados e a quente. A escolha do ácido ou mistura de ácidos depende da natureza da amostra e do método utilizado para a determinação do fósforo (EMBRAPA, 2009).

Na prática, a maioria dos métodos de extração de amostras foliar consiste na combinação de espécies inorgânicas, a fim de combinar as propriedades úteis de cada uma. Segundo a Embrapa (2009), para a extração de fósforo, a matéria do tecido vegetal pode ser oxidada com o HNO_3 , HClO_4 e H_2SO_4 concentrados e a quente, podendo ser utilizado individualmente, misturados ou acompanhados de H_2O_2 no caso do HNO_3 ou H_2SO_4 .

Krug et al (2009) descreve o ácido Nítrico como um agente oxidante mais utilizado na digestão de amostras orgânicas, que libera o fósforo na forma de nitratos solúveis. Quando combinado com H_2O_2 ocorre um grande aumento do poder oxidante. A digestão é feita com o

emprego de fornos de micro-ondas e a velocidade da decomposição da matéria orgânica é uma das vantagens apresentada por esse tipo de equipamento.

Outro ácido bastante utilizado sobre material vegetal é o ácido sulfúrico, usado a quente, que segundo Skoog et al (2008) deve parte da sua eficiência como solvente ao seu elevado ponto de ebulição (cerca de 340°C). Quando combinado com H_2O_2 ocorre um grande aumento do poder oxidante. São bastante utilizados com o auxílio de blocos digestores que chegam a atingir o seu ponto de ebulição e mistura catalítica.

O ácido perclórico é descrito por Krug et al (2009) como um forte agente oxidante para matéria orgânica que apresenta baixo poder complexante. Segundo Nogueira et al. (2005) quando é combinado com de ácido nítrico modera sua ação oxidante sobre matérias facilmente oxidáveis, que poderiam reagir com ácido perclórico de maneira perigosa. No entanto, os vapores altamente corrosivos, que ataca principalmente o bloco digestor e a capela, utilizados nesse procedimento, criando a possibilidade de explosão pelo acúmulo dos vapores de $HClO_4$ na capela são apontados por Silva (2009) como uma das principais desvantagens do seu uso. Além de ser um reagente de difícil aquisição por se tratar de um reagente controlado pelo exército por apresentar perigo de explosão quando em contato com material orgânico.

A digestão nitro perclórica é bastante conhecido e utilizado em digestão de plantas para subsequente determinação de fósforo, devido sua eficiência na decomposição. Em estudo sobre os nutrientes em área de caatinga, Holanda et al (2017) utilizou a digestão nitro perclórica na proporção de 3:1 para extrair o fósforo coletivamente com o K, Ca e Mg. Nogueira et al. (2005) aponta outras vantagens na sua utilização: extração de vários elementos em apenas um procedimento.

A digestão nitro perclórica, com a combinação dos dois ácidos oxidantes, apresenta-se como o método de extração de fósforo mais relevante, no entanto todas as desvantagens atreladas a seu uso, principalmente quanto a segurança, tem incentivado ao uso de outros métodos. O uso de micro-ondas limita o uso da digestão Nítrica por caracterizar-se como um equipamento não disponível facilmente em laboratórios. Assim, a digestão sulfúrica apresenta-se como uma alternativa relevante. A digestão sulfúrica frequentemente é associada ao uso de peróxido de hidrogênio e mistura de catalisadores na proporção de 1:10, respectivamente: K_2SO_4 e $CuSO_4$.

Vaccaro et al. (2004) comparou três métodos de extração de fósforo em tecido vegetal e encontrou maior eficiência pela digestão nitroperclórica e a digestão sulfúrica acompanhada de peróxido de hidrogênio e mistura catalítica, enquanto a digestão acompanhada apenas do peróxido de hidrogênio não apresentou níveis adequados de extração de fósforo. Constatando

que a melhor eficiência de extração de fósforo pela digestão sulfúrica é quando esse ácido acompanhado de peróxido de hidrogênio e a mistura catalítica composta pelos sais $K_2SO_4 + CuSO_4$. Segundo esse autor, a mistura catalítica é fundamental na eficácia do método.

Em estudos comparativos sobre os métodos de digestão Ferreira (2014) verificou que o método mais exato para a extração dos macros e micronutrientes foi com ácido nitroperclórico, no entanto apontou que para a extração de fósforo pode ser utilizado o método da digestão sulfúrica. Recentemente foram empregues para a extração de fósforo o método da digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio em estudos de Freire (2018) e Raulino (2019) com plantas de floresta tropical seca em Araripina, Pernambuco. Esse método de digestão é apontado por Nogueira et al. (2005) como adequado para grande número de amostras e rápido.

As pesquisas que relacionam a digestão sulfúrica com o teor de fósforo normalmente estão atreladas a sua capacidade de extração e a sua utilização. Existe uma lacuna em relação as possíveis variáveis da utilização de um procedimento de digestão que envolvem a composição de uma matriz complexas, que além dos subprodutos da reação encontra-se os catalizadores.

2.2.2 Análise quantitativa de fósforo em material vegetal

A quantificação do teor de fósforo em plantas de floresta tropical seca requer métodos analíticos mais sensíveis devido a concentração de fósforo relativamente baixa nesses solos. Em geral, os métodos de espectrofotometria de absorção molecular no visível são mais rápidos dos que os métodos gravimétricos e volumétricos, além de apresentarem níveis de sensibilidade muito superiores.

Nos métodos espectrofotométricos no visível, a medição consiste em comparar a quantidade de radiação emitida que atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente e a quantidade de radiação que foi transmitida pela amostra analisada. Segundo Skoog et al (2008) a razão entre potência da radiação transmitida e a potência da radiação incidente é denominada de transmitância (T), equação (1), que representa:

$$T = P / P_0 \quad (1)$$

Onde:

T = Transmitância

P = Potência da radiação transmitida

P_0 = Potência da radiação incidente

A lei que rege o processo de absorção de radiação é a Lei de Lambert-Beer (2), que estabelece a relação entre a absorvência, que corresponde ao inverso do logaritmo decimal da transmitância, e a concentração da espécie absorvente (Leal et al, 2007).

$$\log P_0/P = \log (1/T) = A = \epsilon.b.c \quad (2)$$

onde:

ϵ = absortividade molar do analito;

b = comprimento do percurso ótico;

c = concentração da substância absorvente.

Dos métodos espectrofotométricos, destacam-se o do Azul de Molibdênio e o do Amarelo de Vanadato. Para que uma concentração de fósforo de uma amostra seja determinada, por espectrofotometria visível é necessário que ele seja convertido à forma de ortofosfato (Silva et al, 2010). As frações de fósforo do tecido vegetal, fósforo orgânico e inorgânico, após a digestão são convertidos em ortofosfato e sua determinação é caracterizada pela quantificação da soma dessas frações de uma forma única, o fósforo total.

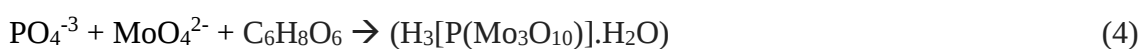
O método do amarelo de vanadato frequentemente está associado a digestão nitro perclórica ou a digestão nítrica no forno micro-ondas e é sugerido por Bezerra Neto e Barreto (2011), neste método o reagente específico (Molibdato de amônio mais Vanadato de amônio) reage com o fósforo formando um complexo de cor amarelada, complexo molibdovanadato-fosfórico (3), o qual apresenta uma sensibilidade relativamente boa na faixa de 0,1 a 20ppm. A intensidade de cor formada é proporcional à concentração de fósforo e pode ser medida em uma espectrofotométrico visível e em seguida correlacionada com soluções padrões de fósforo.



Existe divergência quanto ao comprimento de onda da leitura desse complexo de coloração amarelo. Bezerra Neto e Barreto (2011) sugerem na sua marcha analítica que a leitura seja feita a 470 nm. No entanto pelo método preconizado pela Embrapa (2009) a leitura é feita em 420 nm, mesmo comprimento de onda indicado por Malavolta et al (1997) e Nogueira et al. (2005). Uma justificativa para essa divergência é a inclusão desses complementos de onda na mesma faixa (azul) do espectro visível.

O outro método espectrofotométrico no visível é conhecido por azul de molibdênio, devido a coloração azul característica do complexo formado. Nesse método, segundo Leal et.

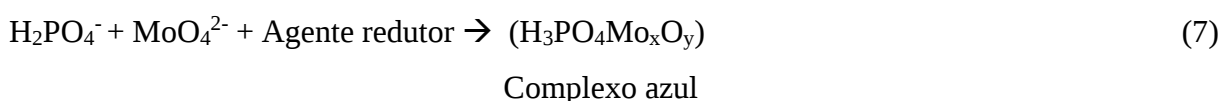
al (2017) o fosfato reage com o molibdato de amônio, em meio fortemente ácido, para formar o complexo fosfomolibdato de amônio, que é reduzido a azul de molibdênio, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de íons fósforo presentes na amostra. Segundo Nogueira et al. (2005) o método está baseado na complexação do íon ortofosfato, em presença de ácido molíbdico, que, em meio fortemente ácido e com um redutor apropriado (p. ex., ácido ascórbico), converte o Mo^{6+} em Mo^{3+} , produzindo o ácido fosfomolibdico, de coloração azul (4) devida ao molibdênio, cuja intensidade da cor é proporcional à quantidade do fosfato contida na amostra, apresentando o máximo de absorção em 660 nm.



Nogueira et al. (2005) é um dos únicos autores que especifica os estados de oxidação envolvidos na reação do complexo azul de molibdênio e propõe uma fórmula (não balanceada) para esse complexo (4). Fontana (2008) e Neto (2006) indicam a formação do complexo ácido de cor amarela (5) inicialmente e a redução á azul de molibdênio após a subsequente adição de agente redutor (6). Mas não especificam a fórmula do complexo de coloração azul formado.



Para formar o complexo conhecido como azul de molibdênio de estequiometria não bem estabelecida (Malavolta et al, 1997) sugerindo a equação (7):



Esse autor indica a forma iônica do ortofosfato H_2PO_4^- devido essa forma ser a predominante em meio fortemente ácido.

Freire (2018) e Raulino (2019) determinaram o fósforo pelo método do molibdato de amônio, conhecido por azul de molibdênio. Esse método apresenta uma sensibilidade e maior e é ideal para análises de baixas concentrações de fósforo como as encontradas em floresta tropical seca.

A Embrapa (2009) em seu manual de análises químicas em tecido vegetal aponta a sensibilidade e estabilidade como a maior diferença entre os métodos entre os métodos de espectrofotometria, amarelo de vanadato e azul de molibdênio. O primeiro citado além de ser o mais usado para a determinação de P em amostras vegetal, consome menos tempo de análise e

apresenta uma maior estabilidade de complexo. No entanto, é menos sensível que o segundo método. O método azul de molibdênio apreenda limitação quando ao pH, sendo o complexo formado sensível a variação de pH.

Segundo Graner et al. (1975) o método do molibdato de amônio sofre interferência de variações operacionais como acidez do meio e concentração de reagentes. No entanto é bastante utilizado para análise de fósforo em solos e em tecido vegetal. Esse autor aponta a extração com solvente como um fator que aumenta a sensibilidade do método.

O uso do método em trabalhos recentes como o de Freire (2018) e Raulino (2019) aponta que diante das limitações do método, esses ainda de sobressaem para determinação de fósforo em tecido vegetal de floresta seca. Por essas razões, esse método será estudado detalhadamente nessa pesquisa.

2.3. INFLUÊNCIA DO EFEITO DE MATRIZ EM RESULTADOS ANALITICOS

Para a cromatografia, a confiabilidade dos dados é comprometida pelo efeito de matriz. Pinho (2009) evidenciou em seus estudos os problemas gerados pelos componentes da matriz nas respostas do detector não depende apenas das características dos compostos, mas também das próprias condições cromatográficas. Ainda expõe a necessidade de conhecer o comportamento da matriz em relação ao equipamento e o funcionamento do método, para adotar medidas preventivas ou corretivas, na tentativa de obter resultados confiáveis. Viera (2003) relata que o efeito de matriz é uma característica conhecida em análises de resíduos de pesticidas, caracterizando-se por resultados acima dos esperados nos estudos de recuperação em estudos cromatográficos.

São questionamentos que devem ser considerados também na espectrofotometria no visível, onde a eficiência da quantificação de fósforo pelo método do azul de molibdênio está diretamente associado com a relação entre a absorbância e a concentração do analito. É necessário a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises é imprescindível. O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBEIRO et al. 2008).

Entretanto, durante as análises os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos. O efeito de matriz é dependente das propriedades físico-química das amostras e das características dos

componentes endógenos da matriz cujas interferências podem aumentar ou diminuir a resposta instrumental do analito (GOULART et al., 2012; PINHO et al., 2010).

Segundo Harris (2012) para que o composto seja analisado por espectrofotometria, ele deve absorver luz e essa absorção deve ser distinguível daquela decorrente da presença de outras substâncias nas amostras. Em amostras complexas como os extratos de digeridos sulfúrico, onde existe a presença de outras espécies no meio além do analito a absorbância retratada nos resultados deve ser analisada. As propriedades de uma molécula não são exatamente as mesmas quando dissolvidas em solventes diferentes alerta Harris (2012)

Assim, qualquer fonte de erro em potencial deve ser investigada e caracterizada, como o efeito de matriz durante as análises de tecido vegetal. Os efeitos de matriz decorrentes da existência de espécies interferentes na amostra, que não estão presentes nos padrões ou no branco, podem fazer que os analitos e os padrões de igual concentração forneçam respostas diferentes. A composição global da solução chama-se matriz, sendo consideradas na sua composição todas as espécies químicas além do analito. Efeito de matriz é uma mudança de sinal analítico causado por qualquer coisa na amostra diferente do analito (HARRIS, 2012).

De acordo com Maruchi (2005) um possível efeito de matriz é esperado quando as reações químicas não alcançam o equilíbrio químico e as medidas podem ser afetadas pela matriz da amostra (principalmente por diferenças na acidez e de intensidade iônica) quando as espécies presentes afetam a cinética das reações.

Pinho (2009) em estudo sobre o efeito de matriz em análises de agrotóxicos atrelou ao efeito de matriz a falta de precisão e exatidão dos seus dados, quando utilizado a calibração externa para a quantificação desses em matrizes de natureza complexa. Segundo Carneiro (2001) é possível observar se há ou não interferências através do ângulo de inclinação que a reta. Para verificação do efeito de matriz, devem-se comparar os coeficientes angulares e lineares de curvas analíticas construídas no solvente e no extrato branco da matriz original (PINHO et al., 2010).

Para a avaliação desse efeito é realizada a comparação da inclinação obtida para a curva em matriz e em solução de padrões nas mesmas proporções de solvente. Caso não haja diferença significativa entre as inclinações das curvas, o efeito de matriz pode ser considerado negligenciável (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

Fortunato (2017) em seu estudo sobre a avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas expôs a vulnerabilidade do método de calibração externo, associando a suscetíveis erros causados principalmente por variações em parâmetros instrumentais e/ou efeitos de matriz que podem deteriorar a precisão e a exatidão dos resultados.

Para amostras vulneráveis a efeito de matriz, Silvestre et al. (2014) indica o uso do método de compatibilização de matriz pode ser uma alternativa eficiente de calibração. Segundo Skoog et al. (2008) é fundamental que nesses casos o padrão de calibração considere a concentração das outras espécies presentes na matriz da mostra.

Esse método consiste em soluções contendo concentrações conhecidas e crescentes do analito e das demais espécies existe na matriz. A concentração do analito presente na amostra pode ser calculada via equação da reta, semelhantemente a calibração com padrão externo. Uma alternativa para corrigir os problemas associados ao efeito de matriz é o método da adição-padrão. Nesse método são adicionadas quantidades conhecidas de analito á amostra desconhecida. Onde a partir do aumento do sinal analítico, deduzimos quando do analito estava na amostra original (HARRIS, 2012)

Em estudos sobre a utilização de grão para explorar a calibração em análise química, Silvestre et al. (2017) obteve resultados a respeito da calibração externa, com adição-padrão e com padrão interno, nesses o uso de calibração com adição-padrão e com padrão interno revelou melhoria da exatidão e precisão dos resultados analíticos, além de corrigir e/ou minimizar as interferências de matriz.

Uma alternativa para minimizar os efeitos da matriz nas análises é o método da diluição. Nesse método, o efeito da interferência é minimizado simplesmente pela diluição da amostra. Algumas vezes o método da diluição pode ser útil se a espécie interferente não produz um efeito significativo abaixo de um certo nível de concentração (SKOOG et al., 2008).

Colzani et al (2017) em estudos de fósforo em refrigerantes indicou que uma maior diluição dos refrigerantes diminuí o efeito da matriz na utilização do método espectrofotométrico no visível com azul de molibdênio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de matriz na determinação de fósforo em espécies arbóreas de floresta tropical seca por espectrofotometria com Azul de Molibdênio.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Verificar a presença de efeito matriz em análise quantitativa de fósforo;

- II. Avaliar a resposta do fósforo na matriz de espécies arbóreas de floresta tropical seca por espectrofotometria com Azul de Molibdênio.
- III. Realizar a análise quantitativa de fósforo em amostra vegetal através do método azul de molibdênio com e sem adição-padrão;
- IV. Monitorar a variação do efeito de matriz provocado pelo método da diluição.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL EM ESTUDO

O material vegetal em estudo advém do município de Araripina, a oeste do estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Essa região está situada sob as seguintes coordenadas geográficas 07°34'34"S e 40°29'54"W e apresenta altitude média de 522m e área total de 1914,40 km² (IBGE, 2010). A vegetação predominante é a floresta tropical seca que, no Brasil, é classificada como Savana-Estépica (Caatinga) (IBGE, 2012).

Como característica marcante dessa região ressalta-se a irregularidade na distribuição das chuvas ao longo do ano (Figura 1). A precipitação pluviométrica entre abril de 2017 e março de 2018 foi monitorada a fim de auxiliar na escolha no material vegetal do estudo para que os períodos sazonais típico do ambiente fossem inclusos. Dessa forma, foram escolhidos dois períodos sazonais com intensidade de precipitação pluviométrica distintas, o período seco e o úmido cujas médias estiveram abaixo de 7,00 mm (julho a outubro) e acima dos 140,00 mm (janeiro a março) respectivamente.

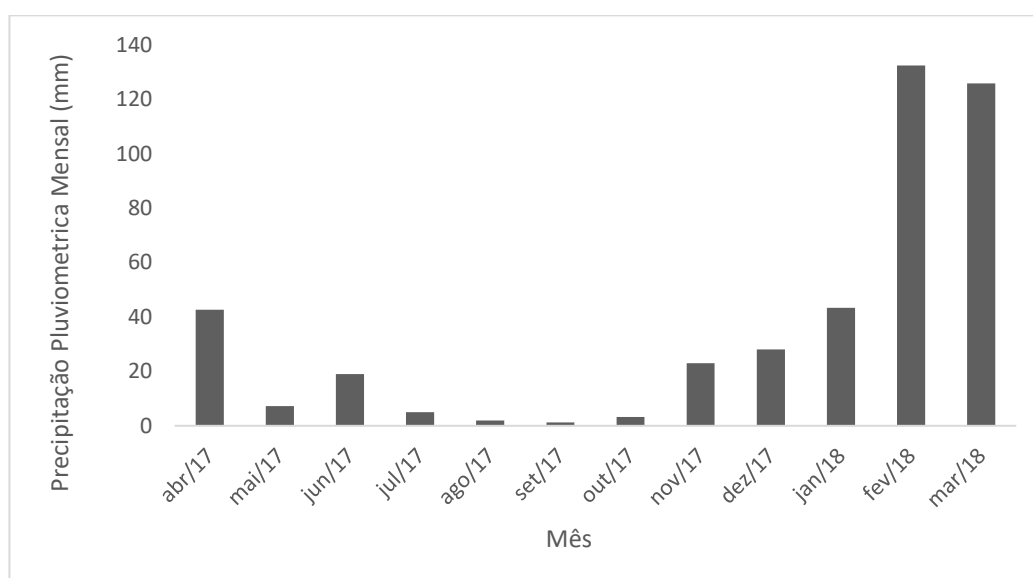


Figura 1 - Precipitação pluviométrica mensal entre abril de 2017 e março de 2018 em floresta tropical seca, Araripina, Pernambuco (APAC, 2018).

Para uma maior representatividade das espécies desse ambiente de floresta tropical seca foi realizado previamente uma consulta ao levantamento florístico e fitossociológico para indivíduos adultos realizado por Freire (2018) e Raulino (2019) em seus estudos com espécies arbóreas dessa região (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização do componente arbustivo-arbóreo das duas espécies de maior densidade absoluta (DA) em floresta tropical seca em Araripina, Pernambuco.

Espécie florestal	DA (Ind. ha ⁻¹)	DR ¹ (%)
<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	310	24,07
<i>Croton limae</i> A. P. Gomes	236	18,32
Σ das duas espécies (maior DA)	546	42,39
Σ das outras espécies	742	57,69
Total	1288	100,0

¹Densidade relativa = (número de indivíduos da espécie i/número total de indivíduos) × 100 (FREIRE, 2018).

As espécies *Guapira opposita* e *Croton limae* apresentam-se em maior quantidade por unidade de área no povoamento amostrado (FREIRE, 2018) e por isso, foram escolhidas para o estudo. As amostras foliares proveniente da serapilheira das espécies foram adquiridas junto ao laboratório de química do solo da Universidade Federal de Pernambuco, oriundo de projeto de pesquisa do programa de pós-graduação em ciência floresta dessa mesma instituição.

O material vegetal foi submetido a secagem em estufa de circulação forçada de ar á 65°C , até peso constante a fim de paralisar todas as reações enzimáticas e moagem mecânica (em moinho Wiley) para reduzir as amostras secas e partículas final além de aumentar a superfície de contato na digestão.

4.2 DIGESTÃO DO MATERIAL VEGETAL

Para a extração de fósforo do tecido vegetal foi utilizado o método preconizado pela Embrapa (2009) na qual a extração é proporcionada pela digestão sulfúrica na presença de peróxido de hidrogênio e misturas de sais. Tal mistura de sais (K₂SO₄ + CuSO₄) atuam como catalisadores, acelerando o processo de degradação do material orgânico presente nas amostras à medida que elevam o ponto de ebulição do líquido. Assim, é possível converter o fósforo da

forma orgânica para íons H_2PO_4^- . Cada espécie contribui com três repetições para cada período sazonal, ou seja, seis repetições para cada amostra sendo três no período úmido e três no seco.

Aproximadamente 0,1 g de cada material vegetal foi pesado em balança analítica e transferido para tubos digestores, onde recebeu posteriormente 1g da mistura catalítica. Mistura catalítica foi preparada pesando proporções de 1:10 dos sais K_2SO_4 e CuSO_4 respectivamente, macerados com auxílio de almofariz e pistilo. Os tubos digestores foram devidamente colocados no bloco digestor e recebeu adição de 3,0 mL de H_2SO_4 98% e 1,0 mL de H_2O_2 .

A digestão foi realizada em bloco digestor acomodado em capela de exaustão sob aquecimento gradual até 350°C , ao atingir a temperatura desejada, cronometrou-se 1 horas para efetuar o desligar. Ao atingir a temperatura ambiente, o extrato é transferido para balão volumétrico de 50 mL e armazenado em recipiente de plástico devidamente identificado.

Para posterior análise da adição-padrão e teste de recuperação, repetiu-se o procedimento anterior, adicionando além dos componentes citados anteriormente, cerca de 1,0 mL e 4,0 mL de solução de padrão de Fósforo $12,5 \text{ mg L}^{-1}$. Ao completar o volume de 50 mL as concentrações dessa adição de padrão resultam em $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo. A quantidade de repetições de cada amostra aumentou devido a adição-padrão contemplar duas concentrações diferentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Esboço da quantidade de amostras de espécies arbóreas que foram submetidas a digestão contendo adição-padrão.

Período	Espécie Arbórea			
	Guapira opposita		Croton limae	
	0,25 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹
Seco	3	3	3	3
Úmido	3	3	3	3
	12		12	
Total de amostras	24			

A digestão também seguiu sob aquecimento gradual até 350°C , ao atingir a temperatura desejada, cronometrou-se 1 horas para efetuar o desligar. Ao atingir a temperatura ambiente, o extrato é transferido para balão volumétrico de 50 mL e armazenado em recipiente de plástico devidamente identificado.

Os extratos após preparados foram submetidos a cinco diluições (Tabela 3) cada repetição de amostra. O volume foi completado para 50 mL e o restante de extrato foi armazenado.

Tabela 3 - Caracterização da proporção de diluição para os extratos de fósforo.

Diluição	Volume do extrato (mL)	Proporção de diluição ¹
1	50	1:1
2	25	1:2
3	16,60	1:3
4	12,5	1:4
5	10,0	1:5

¹ Proporção de diluição: refere-se à quantidade que a matriz foi reduzida.

4.3 PREPARAÇÃO DE CURVA ANALITICA

Foi utilizado dois procedimentos distintos para a preparação das curvas analíticas, a saber: calibração externa e compatibilidade de matriz. A primeira foi feita em solvente puro, ou seja, em água deionizada. Já a segunda foi preparada semelhantemente a matriz das amostras, ou seja, é submetida ao mesmo processo de digestão.

Para cada um dos procedimentos (Calibração externa e compatibilidade de matriz) foi preparado cinco curvas analíticas considerando as possíveis diluições da matriz durante a determinação de fósforo a fim de manter as concentrações de fósforo em cada ponto da curva, a saber: 0,0 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹. Para tal, as curvas preparadas excediam o valor das concentrações citadas acima, na mesma proporção que sofreriam diluição afim de compensar essa interferência da diluição.

A curva analítica segundo a calibração externa foi preparada seguindo o procedimento sugerido pela Embrapa (2009) com adição de volumes crescente de solução padrão de Fósforo. A curva contemplou seis pontos, de 0,0 mg L⁻¹ á 3,0 mg L⁻¹ de fósforo em balão de 50 mL. Posteriormente, foram submetidos a cinco diluições (Tabela 4) cada repetição de amostra. O volume foi completado para 50 mL e o restante de extrato foi armazenado.

A curva analítica segundo a compatibilidade de matriz foi preparada adicionando volumes crescentes de padrão de fósforo em tubos de digestão contendo 1g de mistura de catalítica de sais K₂SO₄ e CuSO₄ na proporção de 1:10 respectivamente. Já no bloco digestor e em capela de exaustão, foi adicionado 3,0 mL de H₂SO₄ 98% e 1,0 mL de H₂O₂. Replicando o mesmo processo submetidos pelas amostras.

Tabela 4 – Caracterização da proporção de diluição para as curvas de fósforo por calibração externa e compatibilidade de matriz.

Concentração da curva analítica (mg L ⁻¹) ²	Proporção de diluição				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Concentração da curva antes da redução proporcional da matriz (mg L ⁻¹) ¹					
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
1,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
1,5	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
2,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
2,5	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
3,0	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0

¹Concentração antes da diluição proporcional. ²Concentração adquirida após diluição descrita na tabela 3.

Ao atingir a temperatura ambiente, o extrato é transferido para balão volumétrico de 50 mL e armazenado em recipiente de plástico devidamente identificado. Os extratos fortificados após preparados foram submetidos a cinco diluições (Tabela 3) cada repetição de amostra. O volume foi completado para 50 mL e o restante de extrato foi armazenado.

4.4 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO

Foi empregado a espectrofotometria com azul-de-molibdênio preconizada pela Embrapa (2009). Segundo essa metodologia, na presença de agente redutor (ácido ascórbico) e em meio fortemente ácido o fosfato extraído na digestão sulfúrica reage com molibdato (MoO₄⁻), formando um complexo de coloração azul, e a intensidade da coloração é proporcional à concentração de P.

Para tal, foi necessário preparar a solução de molibdato que participará da reação. Inicialmente foi preparada uma solução de molibdato de amônio a 2% com o sal (NH₄⁺)₆Mo₇O₂₄ p.a dissolvido em água e subcarbonato de bismuto em meio ácido de H₂SO₄. Essa solução sofre diluição posterior ao preparo de 600mL de água para cada 300 mL de solução, ainda mantendo seu pH ácido.

O espectrofotômetro foi calibrado com as curvas analíticas de acordo com as diluições e sua respectiva sequência de amostras. Em copinhos de café, foram adicionados 5 mL de curva e 10 mL de solução diluída de molibdato de amônio. Adicionou-se uma pitada de ácido

ascórbico e sob agitação manual. A pós 30 minutos a leitura foi realizada. De pose das leituras dos pontos da curva analítica, as amostras foram lidas seguindo o mesmo procedimento.

Vale ressaltar que assim como para cada proporção de diluição sofrida pelas amostras existia uma curva correspondente, leituras em brancos (amostras sem analito) também foram executadas.

4.5 MEDIÇÃO DE pH

Foi realizado a medição eletroquímica da concentração de íons de H^+ nas soluções diluídas do extrato e das curvas antes de após a adição de molibdato de amônio diluído, assim como na própria solução de molibdato de amônio diluído. As leituras de pH foram realizadas em copinhos de café contendo quantidades de extratos diluídos, curva em solvente puro (água), curva em solvente puro contaminada (com pequenos volumes de H_2SO_4 concentrado a fim de atingir ao pH próximo as leituras adquiridas para a curva em matriz) e curva em matriz fortificada em suas respectivas diluições.

Todas as leituras foram repetidas com a adição de molibdato de amônio e de amostra nas proporções de reação, 10 mL e 5 mL respectivamente.

4.6 ANÁLISE DE DADOS E CÁLCULO

O efeito de matriz foi avaliado pela construção de gráficos a partir das curvas de calibração em solvente puro (calibração externa) e em matriz (compatibilidade de matriz). A construção dos gráficos foi feita relacionando a resposta obtida no espectrofotômetro (absorbância) e a concentração de fósforo contida nas curvas analíticas. A regressão linear dos dados obtidos resulta na Equação 8:

$$y = bx + a \quad (8)$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância);

x = concentração do analito;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0

A avaliação do efeito de matriz foi realizada pela comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas em solvente puro e das curvas de calibração preparadas em matriz.

As concentrações de Fósforo em g Kg^{-1} foram comparadas, em cada espécie (no período úmido), assim como nas cinco diluições propostas. O fósforo foi calculado por meio de duas equações distintas, a primeira (8) foi considerando a calibração da curva analítica, por meio da equação da reta. Também foi usado a equação (9) da adição de padrão proposta por Harris (2012) para quantificar o fósforo nas amostras, a saber:

$$\frac{[X]_I}{[S]_F + [X]_F} = \frac{I_X}{I_{S+X}} \quad (9)$$

Onde:

$[X]_I$ = concentração desconhecida do analito (inicial);

I_X = intensidade inicial de sinal do analito;

$[S]_F$ = concentração do analito na solução final;

$[X]_F$ = concentração final do analito;

I_{S+X} = intensidade de sinal do analito na solução final.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de F ao nível de 5% de probabilidade. Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade por meio do uso de software de análise de estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTERFERENCIAS NA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

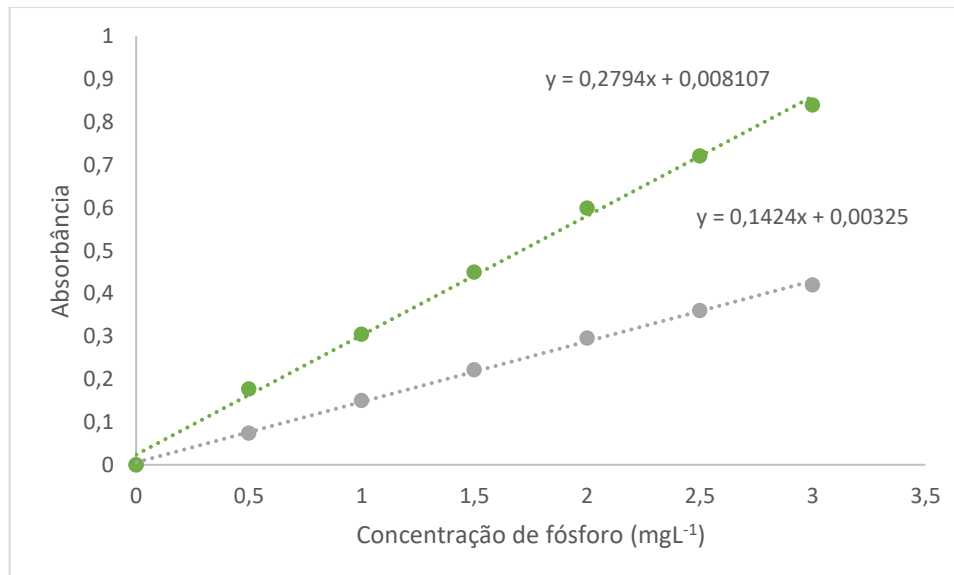
5.1.1 Efeito de Matriz

A leitura das curvas analíticas no espectrofotômetro a 660 nm (Tabela 5) revelou uma diferença entre os valores de absorbância para os mesmos pontos da curva, onde a curva preparada em água obteve sinais superiores. A curva de calibração superior foi feita a partir de soluções-padrão de fósforo em água pura. A mesma análise para as soluções-padrão com as mesmas concentrações, mas em meio a matriz que estava sendo analisada, mostrou uma resposta duas vezes menor. A resposta do sinal do fósforo é um efeito matriz atribuído as outras espécies presentes na amostra.

Tabela 5 - Absorbância das curvas analíticas de fósforo em solvente puro (água) e em matriz.

Concentração de fósforo (mg L ⁻¹)	Curva em Água (Absorbância)	Curva em Matriz (Absorbância)
0,0 mg L ⁻¹	0,0	0,0
0,5 mg L ⁻¹	0,177	0,074
1,0 mg L ⁻¹	0,305	0,15
1,5 mg L ⁻¹	0,375	0,185
2,0 mg L ⁻¹	0,524	0,259
2,5 mg L ⁻¹	0,781	0,39
3,0 mg L ⁻¹	0,828	0,42

Para avaliar o efeito de matriz a curva preparada em solvente puro (água) foi comparada com a curva preparada em matriz. Foram gerados os gráficos de regressão linear (Figura 2) e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos para a curva feita na matriz de amostra foi 0,9814, já para a curva feita com solvente puro o valor foi de 0,9791. Quanto mais próximo o R^2 está da de 1, melhor o modelo linear que explica as variações de y (SKOOG et al, 2008)

**Figura 2** - Gráficos de regressão linear para as curvas de fósforo em solvente puro (verde) e em matriz (cinza).

Para a inclinação do efeito de matriz comparou-se as inclinações das curvas preparadas em solução padrão e em matriz. As razões entre os coeficientes angulares das curvas em solvente puro e da curva em matriz foi de 1,96. Esse valor não está de acordo com a faixa de aceitação indicada por Hoff et al. (2015) para curvas onde não ocorre efeito de matriz.

Segundo Carneiro (2001) é possível observar se há ou não interferências através do ângulo de inclinação que a reta obtida com adições de padrão e amostra, faz com a reta em extrato padronizado em solução aquosa. Se as retas forem paralelas, não há interferências. Portanto, a calibração em solvente puro (calibração externa) não seria recomendada para ser usada em análises de determinação de fósforo pois entende-se que a diferença nos sinais apresentados foi resultado da interferência da matriz na resposta da absorbância.

Segundo Skoog et al (2008) é fundamental que nesses casos o padrão de calibração considere a concentração das outras espécies presentes na matriz da mostra. Possibilitando que as interferências que afetam a amostra também afetem a solução padrão. Esse autor ainda aponta a presença de substâncias interferentes como variável a influenciar na absorbância. Essas substâncias interferentes não se restringem apenas a contaminação externa do meio reacional, mas também a espécies químicas presentes na matriz da amostra.

Como exemplo de diminuição da absorbância de complexos coloridos, Skoog et al (2008) cita a presença de íons sulfato em decorrência da tendência desses ânions de formar complexos incolores com íons metálicos. Em consequência, a reação de formação de cor é frequentemente menos completa, resultando em absorbâncias menores.

Colzoni et al (2017) em estudos de fósforo em refrigerantes indicou que uma maior diluição das amostras de refrigerante diminuí o efeito da matriz na utilização do método espectrofotométrico no visível com azul de molibdênio. A fim de minimizar ao máximo os efeitos de matriz, foi avaliado a influência da diluição sobre o efeito matriz.

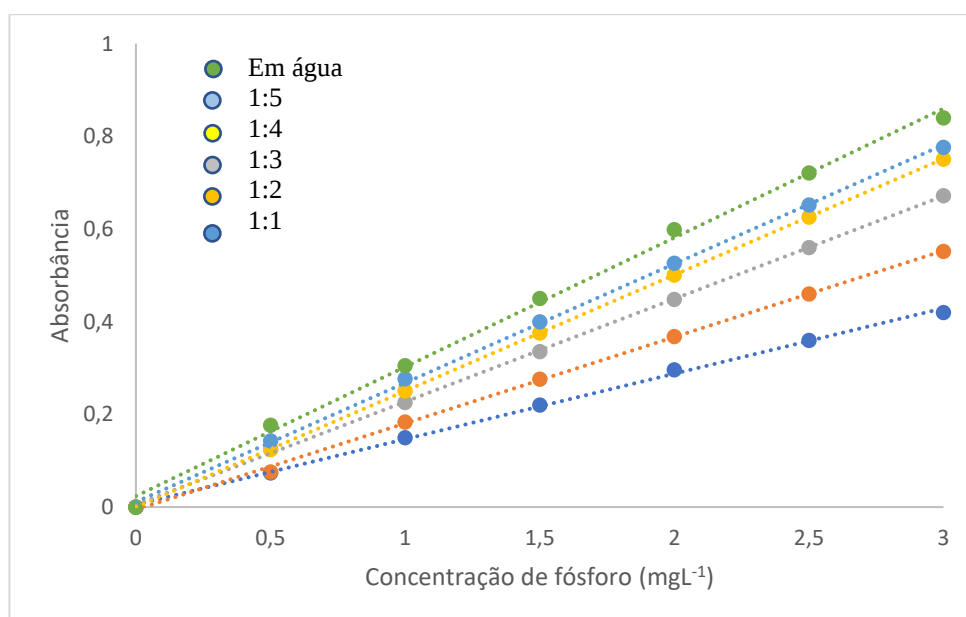


Figura 3 - Gráfico de regressão linear para as curvas de fósforo com as cinco diluições e em solvente puro (água).

A diluição da matriz é uma alternativa em casos como esse, onde a interferência da matriz é minimizada simplesmente pela diluição da amostra (Figura 3). À medida que a matriz da amostra foi sendo diluída, o sinal analítico foi aumentando.

A diluição que mais se aproxima dos sinais analíticos da curva sem interferência da matriz é a que mais sofreu diluição. Nota-se que a diferença entre as curvas diminui com o aumento da diluição, ou seja, a influência exercida pela matriz começa a perder intensidade. Amostras com 1/5 da intensidade da matriz inicial resultou em um aumento dobrado do sinal no ponto de concentração 0,5 mg L⁻¹.

Tabela 6 - Absorbância das curvas analíticas de fósforo em solvente puro (água) e em matriz diluída em determinadas proporções.

Concentração de fósforo (mg L ⁻¹)	Curva em Matriz (Absorbância)					Curva em água (absorbância)
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	
0,0 mg L ⁻¹	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5 mg L ⁻¹	0,074	0,076	0,125	0,124	0,143	0,177
1,0 mg L ⁻¹	0,15	0,184	0,226	0,251	0,277	0,305
1,5 mg L ⁻¹	0,22	0,276	0,336	0,376	0,4	0,45
2,0 mg L ⁻¹	0,296	0,368	0,448	0,501	0,526	0,599
2,5 mg L ⁻¹	0,36	0,46	0,56	0,626	0,652	0,721
3,0 mg L ⁻¹	0,42	0,552	0,672	0,751	0,776	0,84

O aumento da diluição é diretamente proporcional ao aumento da absorbância em 660 nm, ou seja, a um certo nível de concentração as espécies interferentes não produzem efeito significativo (Tabela 6). Skoog et al (2008) alerta sobre a possibilidade de certa dosagem de diluição interferir na habilidade de detectar o analito ou de medir sua resposta. No entanto nesse estudo e com as diluições sugeridas, esse método contribuiu para minimizar os efeitos interferentes da matriz.

5.1.2 Efeito do pH

A leitura do pH das curvas analíticas (Figura 4) confirmou que há uma diferença de pH nas soluções das duas curvas analisadas, onde o meio encontra-se fortemente ácido não só na curva em matriz, mas nos extratos das espécies também, pois ambos foram submetidos a digestão ácida.

Skoog et al. (2008) aponta o pH como um possível interferente para os espectros de absorção. Na figura 3, é possível observar uma variação do sinal analítico frente a diferença de acidez nas curvas analíticas, no qual a curva em água no meio acidificado apresenta absorbância

menor do que a curva só em água (Tabela 6). Essa nova curva em água acidificada com ácido sulfúrico se aproximou mais das absorvâncias da curva em matriz.

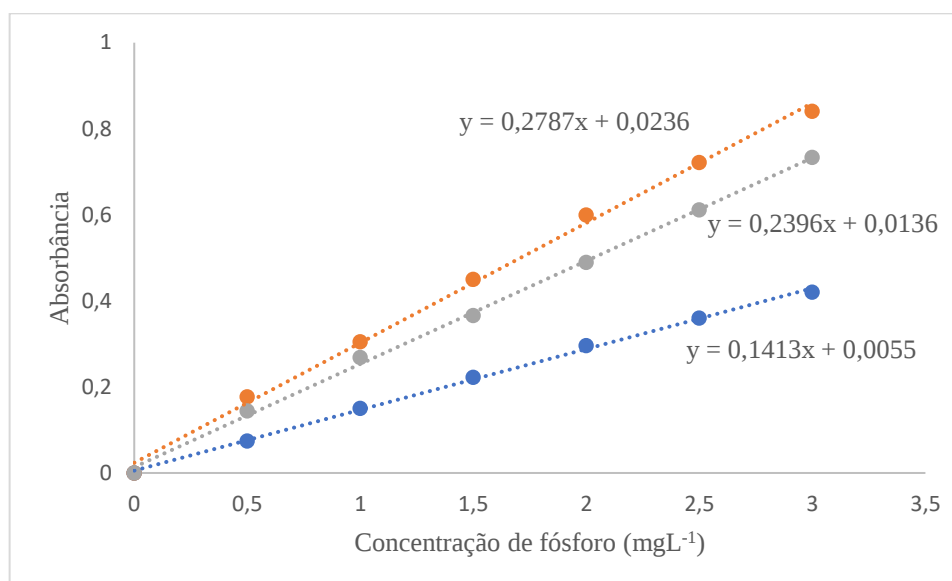


Figura 4 - Gráfico de regressão linear para as curvas de fósforo em matriz (azul), em água (laranja) e em água acidificada (cinza).

A razão entre os coeficientes angulares das curvas em solvente em água acidificada e em matriz foi de aproximadamente 1,7. Menor se compararmos com a razão das inclinações da curva em água e em matriz. No entanto, esse valor ainda não está de acordo com a faixa de aceitação indicada por Hoff et al. (2015) que corresponde a uma razão entre 0,9 e 1,1. Assim apesar do pH apresentar uma influência sobre a absorvância na determinação de fósforo, essa é menos pronunciada que a interferência do efeito matriz.

As proporções de diluição aplicada as curvas analíticas e aos extratos das espécies revelaram uma diminuição da acidificação do meio, mesmo que pequena em todos os tratamentos, mantendo a diferença entre si (Tabela 7).

Tabela 7 - Leitura da média de pH dos extratos de fósforo e nas curvas analíticas de fósforo nas cinco proporção de diluição.

Proporção de diluição	Espécies Extrato	pH		
		Curva Matriz	Curva H ₂ O	Curva acidificada ¹ H ₂ O
1:1	0,77	0,85	3,34	0,88
1:2	0,94	0,99	2,92	0,94
1:3	1,10	1,11	3,15	1,18
1:4	1,21	1,20	3,13	1,24
1:5	1,28	1,25	3,04	1,39

¹Proporcionalmente foi forçado um pH próximo aos extratos obtidos após digestão.

A diluição das soluções (curvas e extratos) revelou uma diminuição da acidificação do meio, mesmo que pequena em todos os tratamentos, mantendo a diferença entre si.

Vale ressaltar que os valores de pH na tabela 7, são referentes ao pH do meio das soluções antes do meio reacional para análise. Ou seja, a adição de molibdato de amônio acidificou o meio, deixando o pH de todas as curvas <1 , diminuindo consideravelmente o pH da curva em água e ainda assim, as diferenças entre a curva em água e a curva em matriz se mantiveram. O pH entre a curva em meio acidificado e em matriz denotam semelhanças entre si e ainda assim, apresentam diferenças significativas no sinal analítico. Ou seja, na determinação de fósforo, o efeito de matriz apresenta influência mais significativa sobre as absorbâncias da curva analítica que o pH.

Nogueira et al (2005) afirma que a reação de complexação entre o íon H_2PO_4^- com o molibdato (MoO_4^{2-}) ocorre em meio fortemente ácido e denota baixa estabilidade e sensibilidade a variação de acidez. Assim, o meio fortemente ácido irá auxiliar na reação de complexação e esperava-se que as soluções com meio menos ácido refletissem uma absorbância menor, sugerindo que o pH do meio influenciou negativamente para a resposta. No entanto, a curva que apresentou menor pH ácido foi a que resultou em absorbância maiores.

A sensibilidade a acidez afeta a velocidade da redução do molibdo-fósforico segundo Maruch (2005). A realização da medição realizada próxima do equilíbrio compensa as influências da acidez e do efeito matriz. Tais resultados podem ser justificado pela compensação da acidez do meio ocasionada pela adição de molibdato de amônio fortemente ácido e ao tempo reacional determinado pelo método seguido.

Maruch (2005) também observou em seus estudos uma diminuição do sinal analítico na quantificação de fósforo em uma determinada faixa de acidez. Os resultados mostraram que concentrações ácidas de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ afetam significativamente as medidas. Esta observação está de acordo com o esperado, visto que o ácido ascórbico apresenta maior eficiência como redutor quando na forma dissociada (ânion ascorbato). Desta forma a eficiência do ácido ascórbico como agente redutor é altamente dependente da acidez.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO EM ESPÉCIES ARBÓREAS DE FLORESTA TROPICAL SECA, ARARIPINA – PERNAMBUCO

5.2.1 Dinâmica da recuperação de fósforo em espécies arbóreas

A recuperação de fósforo aumentou sua eficiência à medida que a diluição da matriz aumentou (Tabela 8) nas duas espécies para todos os períodos sazonais. E apontou que a matriz

dificulta a recuperação de fósforo, ao qual os dois níveis de adição de padrão utilizado, 0,25 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ apresentaram valores muito próximo de 100% nas amostras continham apenas 1/5 da matriz inicial, ou seja, a diminuição da intensidade da matriz favoreceu a recuperação do fósforo.

Tabela 8 - Percentual recuperado (%) de fósforo pela adição-padrão nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.

Floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição:											
Período Sazonal	Espécie	Diluição da Matriz									
		1:1		1:2		1:3		1:4		1:5	
Concentração de P adicionada (mgL ⁻¹)											
0,25 1,0 0,25 1,0 0,25 1,0 0,25 1,0 0,25											
Percentual Recuperado											
Seco	<i>Croton Limae</i>	36,70	44,46	52,65	53,72	73,93	73,68	89,28	99,38	98,58	101,05
Úmido	<i>Croton Limae</i>	49,87	51,75	65,46	65,81	79,39	81,64	95,66	98,84	101,05	101,66
Seco	<i>Guapira Opposita</i>	38,58	44,93	51,23	52,29	63,15	78,03	82,90	97,78	98,58	98,58
Úmido	<i>Guapira Opposita</i>	31,53	50,94	58,34	59,41	73,97	81,64	91,40	94,59	101,05	102,28

As espécies *Croton Limae* e *Guapira Opposita* apresentaram no período seco uma recuperação menor em todos as proporções de diluição da matriz, apesar das diferenças serem diminuídas ao longo das diluições. Raulino (2019) obteve os menores teores de fósforo *Croton Limae* e *Guapira Opposita* nos períodos sazonalmente seco e sugeriu que as variáveis ambientais como as condições climáticas promoveram diferenças entre a quantidade de nutrientes aportada na serapilheira de cada período.

De acordo com Nogueira et al. (2005) o método azul de molibdênio apresenta alta sensibilidade quanto a baixas concentrações do analito. Assim mesmo em baixas concentrações, como no caso das espécies no período seco, a recuperação de fósforo entre as duas concentrações de padrão adicionadas não deveria ser distante uma da outra. No entanto, a recuperação de 1,0 mg L⁻¹ de fósforo em todas as proporções de diluição mostrou-se mais eficiente. Nas espécies no período seco e sem diluição da matriz, isso fica mais evidente. Tal comportamento pode ser justificado pela influência da matriz na a reação de complexação entre o íon H₂PO₄⁻ com o molibdato (MoO₄²⁻), que fica ainda mais marcante quando há baixas quantidades de fósforo no meio reacional.

5.2.2 Teor de fósforo sem adição-padrão

As espécies *Croton Limae* e *Guapira Opposita* apresentaram diferenças significativa na quantificação no teor de fósforo nas cinco proporções de diluição, e nos períodos seco e úmido (Tabela 9). O teor de fósforo aumentou diretamente proporcional a diminuição da intensidade da matriz, ou seja, o efeito matriz compromete o registro do teor de fósforo pelo método de azul de molibdênio. A diluição de matriz se apresenta como uma boa alternativa para compensar o efeito matriz sem modificar o método em questão.

A espécie *Croton Limae* e *Guapira Opposita* diferem entre si tanto no período úmido quando no período seco. O teor de fósforo na *Guapira Opposita* é maior no período úmido e seco apresentando média de 0,78 g Kg⁻¹ e 0,29 g Kg⁻¹ respectivamente. Raulino (2019) em estudos avaliando o teor de P em quatro espécies arbóreas de floresta tropical seca, encontrou média entre espécies variando de 0,87 a 2,01 g kg⁻¹. Esses valores correspondem ao teor mínimo e máximo e refere-se as espécies *Croton Limae* e *Guapira Opposita* respectivamente.

Tabela 9 - Teor de fósforo (g kg⁻¹) nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.

Período Sazonal	Espécie	Diluição da matriz					Média
		1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	
		g kg ⁻¹					
Seco	<i>Croton Limae</i>	0,08eD	0,08dD	0,09cD	0,12bD	0,14aD	0,12
Úmido	<i>Croton Limae</i>	0,48eB	0,77dA	0,79cB	0,80bB	0,88aB	0,74
Seco	<i>Guapira Opposita</i>	0,22eC	0,23dC	0,30cC	0,34bC	0,35aC	0,29
Úmido	<i>Guapira Opposita</i>	0,63eA	0,69dB	0,75cA	0,82bA	1,04aA	0,78
Média		0,35	0,44	0,48	0,52	0,60	
CV (%)		0,23	0,44	0,46	0,30	0,51	

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas colunas (espécies) e minúsculas nas linhas (Diluição da matriz) não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5 % de probabilidade.

Em relação ao período sazonal, em ambas as espécies o teor de P é maior no período úmido. Em seus estudos, Freire (2018) associa ao maior teor de fósforo encontrado no período úmido a maior disponibilidade de água no solo, indicando maior absorção desse nutriente nesse período.

5.2.3 Teor de fósforo com adição-padrão.

Na espécie *Guapira Opposita* nos dois períodos sazonais a concentração de fósforo foi semelhante nas diluições com menor intensidade de matriz: 1:3, 1:4 e 1:5 (Tabela 10). Podemos considerar que para quantificar o fósforo da espécie *Guapira Opposita* a diluição em 1:3 da matriz é suficiente para minimizar satisfatoriamente as interferências causada pela matriz.

A espécie *Croton Limae* apresentou comportamento diferente nos dois períodos avaliados. No período úmido, a partir da diluição de 1/2 os resultados se assemelham, ou seja, os efeitos interferentes da matriz são minimizados com a diluição de 1/2 da matriz. No entanto para o período seco essa espécie necessitaria de uma diluição mais intensa da matriz.

Tabela 10 - Teor de fósforo (g kg^{-1}) por adição-padrão nas espécies arbóreas de floresta tropical seca nas cinco proporções de diluição.

Período Sazonal	Espécie	Diluição da matriz					Média
		1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	
		g kg^{-1}					
Seco	<i>Croton Limae</i>	0,14dD	0,18cC	0,18cC	0,22bC	0,28aD	0,20
Úmido	<i>Croton Limae</i>	0,86bB	0,95aA	1,07aA	1,12aA	1,32aA	1,06
Seco	<i>Guapira Opposita</i>	0,37cC	0,41bB	0,50aB	0,55aB	0,68aC	0,51
Úmido	<i>Guapira Opposita</i>	1,03bA	0,11bA	1,08aA	1,26aA	1,48aA	1,18
Média		0,60	0,65	0,71	0,79	0,94	
CV (%) ²		1,23	0,44	0,46	1,18	0,51	

Letras maiúsculas iguais nas colunas (espécies) e minúsculas nas linhas (Diluição da matriz) não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5 % de probabilidade.

Ao que tange a comparação entre as espécies e os tempos sazonais, vale ressaltar as semelhanças encontradas entre as espécies no período úmido, comportando os maiores teores de fosforo $1,06 \text{ g Kg}^{-1}$ e $1,18 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente para *Croton Limae* e *Guapira Opposita*. Nota-se que o efeito de matriz é minimizado mais facilmente quando os teores de fósforo são mais elevados. No período seco a necessidade de uma diluição maior da matriz se relaciona com os baixos teores encontrados nas espécies nesse período.

Em floresta tropical seca, durante a estiagem, os nutrientes estocados no solo não conseguem ser absorvidos pelas plantas devido à redução no conteúdo de água no solo (FAQUIN, 2005). Com isso, podem ser retranslocados dentro da planta, no ciclo bioquímico,

das folhas mais velhas para as mais novas e para as folhas remanescentes (MENGEL; KIRKBY, 1982). No período úmido, o solo passa a exercer maior influência, via ciclo biogeoquímico, fornecendo nutrientes (REIS; BARROS, 1990). Isso justifica a diferença dos teores de fósforo encontrados nos dois períodos sazonais.

5.2.4 Comparação entre os teores de fósforo sem e com adição-padrão

A adição-padrão utilizada para quantificar o fósforo nas espécies resultou em dados que conversam entre si. Harris (2012) sugere o uso dessa prática para análises como a desse estudo, no qual a composição é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico.

Na tabela 9, referente a análise sem adição-padrão nota-se que os teores de fósforo não conversam entre si e as diluições realizadas seguem dando concentrações de fósforo independentemente ainda que maiores, indicando que a calibração externa conseguiu registrar a minimização do efeito matriz pelas diluições. Porém essa detecção foi bem limitada comparada a adição-padrão.

Nos teores de fósforo por adição-padrão (Tabela 10) percebe-se a minimização do efeito matriz com a utilização de $\frac{1}{2}$ da matriz, como no caso da *Guapira Opposita* nos dois períodos sazonais e da *Croton Limae* no período úmido. O aumento do teor de fósforo pela adição-padrão associado a diluição da matriz resultou em efeitos significativos na quantificação de fósforo, sobrepondo-se ao efeito de matriz.

Sobre a calibração com adição-padrão, Silvestre (2017) apresentou em seu estudo, a correção e/ou minimização das interferências de matriz em análises com grãos. Também associa a esse método de calibração a melhoria da exatidão e precisão dos resultados analíticos. Em estudos apresentados por Fortunado (2017) os erros causados por efeitos de matriz foram corrigidos de maneira eficiente utilizando o método de adição de padrão, mostrando ser uma estratégia de calibração eficiente para técnicas espectrofotométricas.

Além da eficiência da adição-padrão na minimização do efeito de matriz, a diluição da matriz também se mostrou uma alternativa relevante na determinação de fósforo pelo método azul de molibdênio. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo de fósforo em refrigerantes pelo método, onde Colzani et al. (2017) observou a diminuição do efeito de matriz ao diluir amostras de refrigerantes na análise.

6 CONCLUSÃO

Houve efeito de matriz na determinação analítica de fósforo pelo método azul de molibdênio. O efeito de matriz resultou em diminuição da absorção e consequentemente do teor de P quantificado.

O emprego de diluição combinada adição de padrão de P mostrou-se eficaz em minimizar o efeito de matriz. A diluição reduziu a influência do pH sob a absorbância.

As espécies *Croton limae* e *Guapira opposita* apresentou maiores teores de P no período úmido do que no período seco. A *Guapira opposita* apresentou maior teor de P do que a *Croton limae*. Quanto mais baixo os teores de P nas espécies vegetais maior é o efeito de matriz.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVES, A. R. *et al.* Nutrientes na biomassa aérea e na serapilheira em áreas de caatinga em Floresta, PE. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 37, n. 92, p.413-420, 2017.

AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA (APAC). **Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/>>. Acesso em: 02.abr. 2019.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Análises químicas e bioquímicas em plantas**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2011. p 267.

BOCCUZZI, G. **Nitrogênio e fósforo na interface atmosfera-vegetação arbórea-solo de remanescentes de Floresta Atlântica expostos a fatores de estresse ambiental**. 2017. 126 f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

BONSER, A. M.; LYCH, J. P.; SIEGLINDE, S. Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, v. 132, p. 281-288, 1996.

CARNEIRO, C.; **Comparação de cinco métodos de análise química foliar utilizando erva-mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill) como matriz analítica**. 2001. 153f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

COLZANI, H. et Al.; Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de química. **Quím. Nova**, v. 40, n. 7, p. 833-839, 2017.

DECHEN, A. R.; MACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. v. 7, cap. 3, p. 91-132.

DONOHUE R. J. et al. Impact of CO₂ fertilization on maximum foliage cover across the globe's warm, arid environments. **American Geophysical Union**, Washington, v. 40, p. 3031–3035, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Manual de análise química de solo, planta e fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

FAQUIN, V. **Diagnose do estado nutricional das plantas**. Lavras, MG:UFLA/FAEPE, 2002. 77 p.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. 2005. 186 f. Dissertação (Especialização em Solos e Meio Ambiente) – Curso de Pós-graduação “Lato Sensu” a Distância em Solos e Meio Ambiente. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FERREIRA, A. K. C.; **Avaliação de métodos de análises químicas de nutrientes em tecido vegetal**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo e Água) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

FONTANA, J. F.; **Determinação de fósforo em amostras superficiais de sedimentos das regiões portuárias do estado de Santa Catarina, Brasil**. 2008. 49f. Monografia (Graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FORTUNATO, F. M.; **Avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas**. 2017. 166 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal Paulista, São Paulo.

FREIRE, C. S.; **Ciclagem de nutrientes em função da sazonalidade climática e do gradiente de altitude em floresta tropical seca**. 2018. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GRANER, C.A.F.; MEIRA, D.R. & MUCCIOLO, P. - **Determinação do teor de fósforo em produtos cárneos. I. Método para dosagem do fósforo**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 35/36: 55-63, 1975/76.

GOMES, M.A.F.; SOUZA, M.D. de; BOEIRA, R. C.; TOLEDO, L. G. de. **Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 50 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 18).

GOULART, S. M. et al. Avaliação do efeito de matriz na análise de carbamatos em bebidas de interesse forense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 52. 2012, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: UFPe, 2012. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/4/704-14120.html>>. Acesso em 20 Jun. 2019.

GUERREIRO, M. J. S. et al. Long-term variation of precipitation indices in Ceará State, Northeast Brazil. **International Journal of Climatology**, New York, v. 33, n. 14, p. 2929-2939, 2013.

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**, 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora LTC, 2005.

HOLANDA, A. C. et al. Aporte de serapilheira e nutrientes em uma área de Caatinga. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 621-633, 2017.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. 2ªed revisada e ampliada. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2012. 271 p.

KRUG, F.J. Métodos de Decomposição de Amostras. IN: 111 **Workshop sobre Preparo de Amostras**. São Carlos, SP. 2000. 148p.

LEAL, A. A. X. *et al.* Validação e estimativa de incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-Vis. **Revista Analytica**. 2008. N.32

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

MARTIN-PREVEL, P.; GAENARD, J.; GAUTIER, P. **L'analyse vegetable dans le controle de l'alimentation des plantes temperées et tropicales**. **Technique e Documentation**, 1984. 802 p.

MARUCHI, A. K.; **Fracionamento de fósforo em plantas empregando diferentes procedimentos de preparo de amostras e sistemas de análise em fluxo monossegmentado**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1982. 655p.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biomass**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biomass/caatinga/>>. Acesso em: 20.fev.2020.

NOGUEIRA, A. R. A et Al. Tecido Vegetal. In: _____. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: EMBRAPA, 2005.

NETO, O. D. P.; **Determinação de Fósforo em Tônicos Fortificantes por Fotometria de Chama Usando um Titulador Fluxo-Batelada**. 2006. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

PINHO, G. P.; **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxico por cromatografia gasosa**. 2009. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

PINHO, G. P. et al. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

RAULINO, W. N. C.; **Contribuição de espécies arbóreas para a ciclagem de nutrientes em florestas tropicais seca e úmida**. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

REIS, M. G. F.; BARROS, N. F. Ciclagem de nutrientes em plantios de eucalipto. In: BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1990. p.265-301.

RIBEIRO, F. A. L. et al. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SAMPAIO, E.V.S.B. et al. Capacidade de suprimento de N e resposta à fertilização de vinte solos de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.20, p. 269-279, 1995.

SANTANA, J. A. S.; SOUTO, J. S. Produção de serapilheira na Caatinga da região semi-árida do Rio Grande do Norte, Brasil. **IDESIA**, Arica, v. 29, n. 2, p.87-94, 2011.

SANTOS, R. L. et al. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum) biomass production with gypsum application as alternative source of energy in Brazil's semiarid area. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 9, p. 1082-1088, 2015.

SELLE, G. L. **Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais**. Biosci.j.,Uberlândia,v. 23, n. 4, p. 29-39,2007.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, planta e fertilizantes** / (Ed) – 2. ed. Ver. Ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

SILVA, F. S. V. C. B., SILVA, V. L., LAVORANTE, A. F., PAIM, A. P. S. Utilização de planejamento fatorial no preparo de amostras de detergente em pó para a determinação de fósforo por análise em fluxo. **Rev. Quím. Nova** 2010; 33(5):1199-1203.

SILVESTRE, D. M.; NAOZUKA, J.; CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S. Experimento utilizando grãos para explorar a calibração em análises químicas. **Quím. Nova**, v. 37, n. 9, p. 1545-1549, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2008.

SOUZA, N. H. et al. Estudo nutricional da canafístula (ii): eficiência nutricional em função da adubação com nitrogênio e fósforo. **Revista Árvore**, MG, v. 36, n. 5, p. 803-812, 2012.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. **Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2004.

VACCARO, S.; Brun, E. J.; Schumacher, M. V.; König, F. G.; Isabel, S. K.; Ceconi, D. E. Comparação Entre Três Diferentes Métodos de Análise de Tecido Vegetal. **Colombo**, n. 48, p. jan./jun, 2004.

VIEIRA, E.; **A influência do efeito matriz na determinação dos pesticidas organoclorados e organofosfatados em amostras de manga**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

YDI, S. J.; Um estudo dos níveis solúveis de fósforo em córregos urbanos, em função das características de ocupação das áreas drenadas. .2000. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.