

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Mônica Ferreira e aprovado pela Comissão Julgadora.

11/09/87

Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas com Azometina-H, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado

Tese de Mestrado

MÔNICA FERREIRA

Orientador: João Carlos de Andrade

Campinas - 1987

## CANÇÃO AMIGA

Eu preparo uma canção  
em que minha mãe se reconheça,  
tôdas as mães se reconheçam,  
e que fale como dois olhos.

Caminho por uma rua  
que passa em muitos países  
Se não me vêem, eu vejo  
e saúdo velhos amigos

Eu distribuo um segredo  
como quem ama e sorri.  
No jeito mais natural  
dois carinhos se procuram

Minha vida, nossas vidas  
formam um só diamante.  
Aprendi novas palavras  
e tornei outras mais belas.

Eu preparo uma canção  
que faça acordar os homens  
e adormecer as crianças.

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

Aos meus pais,  
JOÃO E CLAUDINA, pelo amor  
e estímulo constantes, sem  
os quais seria muito difí-  
cil chegar até aqui.

Ao KALIL,  
pelo amor e companheiri-  
s-  
mo ao longo destes anos.

Ao JOÃO CARLOS,  
pela dedicação, amizade e con  
fiança depositados em mim, du  
rante o tempo em que trabalha  
mos juntos.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto de Química-UNICAMP e ao Instituto Agronômico de Campinas pelas facilidades concedidas na execução deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo.
- Ao Prof.Dr. João Carlos de Andrade pela orientação segura.
- Ao Prof. Dr. Célio Pasquini e ao Dr. Ondino C. Bataglia pelas sugestões e discussões valiosas.
- À Bell, Solange e Sônia pela companhia e ajuda no laboratório.
- Aos funcionários da SNFS-IAC pela amizade e os bate-papos nas horas do almoço e dos cafezinhos.
- A todos os funcionários do IQ que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização desta tese, particularmente ao Walter, Mário, Cebola e Terrível, pela ajuda na montagem do sistema de desenvolvimento neste trabalho.
- Aos funcionários da Biblioteca do IQ, em especial ao Toninho e Ledenice, pelo auxílio com relação às citações bibliográficas.
- Ao Laurindo pela impressão e montagem final desta tese.
- À Marilza pela datilografia e à Eliane pelos desenhos.
- Aos amigos do Instituto de Química, em especial ao Ivo pelos papites e ajuda constantes no laboratório.

Quando se possui a seu lado,  
compreensão, apoio e incentiu  
vo, atingir certos objetivos  
se torna mais fácil, e todos  
estes aspectos se resumem em  
se ter ao meu lado alguém  
como a LOLLY.

## RESUMO

Foi desenvolvido um procedimento para a determinação espectrofotométrica de boro usando a técnica de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM) e o reagente colorimétrico azometina-H. Sob as condições experimentais de rotina, a curva analítica é linear até  $4,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . O limite de detecção encontrado foi de  $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ , calculado a partir do desvio padrão do sinal do branco, considerando a razão sinal-ruído igual a três. Como o ciclo de injeção é completado em 30s, a velocidade de amostragem é de  $120\text{h}^{-1}$ . Os elementos interferentes, comumente presentes nas plantas, foram investigados sob as condições dinâmicas do método de AFCM. Como esperado, ferro e cobre apresentam as interferências mais significativas. Neste método de AFCM para a determinação de boro foram empregadas amostras testadas pelo "Plant Sample Exchange Programme" (PSEP) da Universidade de Wageningen. Os resultados obtidos foram comparados favoravelmente com aqueles observados pelo procedimento estático convencional bem como com aqueles publicados pelo PSEP.

## ABSTRACT

A monosegmented continuous flow analysis (MCFA) procedure for the spectrophotometric determination of boron using azomethine-H as color reagent is presented. Under the experimental conditions described the analytical curve is linear up to  $4.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The detection limit found is  $0.02 \mu\text{g ml}^{-1}$ , calculated from three times the standard deviation of the blank signal. As the injection cycle is completed in 30s, the actual sampling rate is  $120\text{h}^{-1}$ . The common interfering elements present in plants were investigated under the dynamic MCFA conditions. As expected, iron and copper present the most severe interferences. This MCFA method for boron determination was used with test samples from the Plant Sample Exchange Programme (PSEP) of the Wageningen Agricultural University. The results compared favourably with those obtained by the conventional static procedure as well as those published by the PSEP.

## ÍNDICE

	pag.
Capítulo I	
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo II	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
II.1. Importância do Boro nas Plantas.....	6
II.2. Métodos de Análise de Boro.....	12
II.2.1. Métodos Espectrográficos de Emissão.....	13
II.2.2. Métodos Colorimétricos Convencionais.....	15
- Método do Azul de Metileno.....	16
- Método da Quinalizarina.....	16
- Método da Curcumina.....	18
- Método da Azometina-H.....	20
- Outros Métodos.....	23
II.2.3. Métodos em Fluxo Contínuo.....	24
- Análise em Fluxo Contínuo Segmentado:.....	24
- Análise em Fluxo Contínuo Não-Segmentado..	30
- Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado.	36
Capítulo III	
PARTE EXPERIMENTAL.....	37
III.1. Síntese do Reagente.....	38
III.2. Soluções e Tratamento das Amostras.....	38
III.3. Condições Experimentais.....	40
III.4. Estudo dos Interferentes.....	49
Capítulo IV	
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

Capítulo V

CONCLUSÃO.....	84
Apêndice 1 - Métodos Automáticos.....	87
Apêndice 2 - Soluções.....	88
Apêndice 3 - Programa Computacional (Basic).....	91
Bibliografia.....	92

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

O boro foi descoberto por Sir Humphry Davy e por Gay Lussac e Thenard<sup>(1)</sup>. Este elemento não é encontrado livre na natureza. Em rochas este elemento se apresenta sob formas químicas associadas, sendo portanto um elemento litófilo.

Estima-se que a crosta terrestre seja constituída de aproximadamente 0,001% de boro, que também é encontrado na água do mar em concentrações relativamente altas (em torno de  $4,6 \mu\text{g g}^{-1}$ )<sup>(2)</sup>, sendo portanto considerado um elemento geoquimicamente móvel. A abundância natural das formas isotópicas do boro é de 19,78% para o isótopo  ${}^5\text{B}^{10}$  e 80,22% para o isótopo  ${}^5\text{B}^{11}$ .

Em geral o boro se apresenta naturalmente em combinação com o oxigênio, isto provavelmente ocorre porque o boro possui pequeno raio iônico ( $0,23 \text{ \AA}$ ), alta densidade de carga e forte tendência a ligar-se covalentemente<sup>(3)</sup>. Quimicamente as formas existentes na natureza são os boratos ou seus derivados aniônicos. Nos solos neutros predomina a forma  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (ácido bórico) e em solos com pH acima de 9,2, ou seja os solos alcalinos, o boro se apresenta sob a forma de íons borato,  $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ <sup>(4)</sup>.

Atualmente o boro é explorado comercialmente em acumulações de boratos hidratados, formados pela evaporação de lagos salgados ou da água do mar, ou ainda em acumulações encontradas em regiões onde há atividade vulcânica ou tenha ocorrido este ti

po de fenômeno durante a era Cenozôica(\*)<sup>(4)</sup>.

A extração do boro é feita a partir dos minerais da série do bórax: o bórax propriamente dito,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; a kernita,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e a trincalconita,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , que são os minerais de maior viabilidade econômica.

O elemento boro apresenta características ópticas interessantes, como por exemplo, a capacidade de transmissão de algumas faixas da radiação infravermelho. A ulexita,  $\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , é considerada a versão natural das fibras ópticas<sup>(1)</sup>.

Este elemento apresenta baixa condutividade elétrica à temperatura ambiente, porém observa-se um aumento na sua condutividade elétrica conforme se eleva a temperatura<sup>(1)</sup>.

Considera-se o boro um dos mais importantes agentes dopantes em materiais semicondutores<sup>(1)</sup>, nos quais é incorporado tanto no seu estado eletricamente ativo como no seu estado eletricamente inativo. A concentração total do estado eletricamente ativo tem grande influência na corrente máxima conduzida pelo material e sua distribuição define o ganho do transistor, enquanto que a fração inativa afeta o processo de difusão através da formação do "cluster"<sup>(6)</sup>.

Nas indústrias metalúrgicas o boro tem sido largamente utilizado (com concentrações variáveis entre 0,001% e 0,005%) com a finalidade de aumentar a dureza do aço<sup>(2)</sup>. Tem havido atualmente demanda com relação às fibras de boro, que possuem alta resistência e baixo peso e estão sendo muito empregadas em estruturas

---

(\*) Era Cenozôica: era cronológica que se caracteriza pela extinção dos reptis gigantes, por notável desenvolvimento dos vertebrados e pelo aparecimento do Homem no último período desta era<sup>(5)</sup>.

aero-espaciais<sup>(1)</sup>.

Quando impuro, o boro é denominado amorfo e se apresenta sob forma de um pó castanho escuro, com uma composição entre 90 e 92% em boro. O boro amorfo é comumente usado em espetáculos pirotécnicos com a finalidade de produzir a cor verde, bem como para promover a ignição dos rojões<sup>(1)</sup>.

O isótopo do boro pode ser empregado como absorvedor de nêutrons em reatores nucleares devido à grande secção de choque deste isótopo<sup>(2)</sup>.

Os compostos de boro, principalmente o bórax, têm grande aplicação nas indústrias de cerâmicas para a manufatura de vidros de borossilicato<sup>(2)</sup>. Os óxidos de boro nestes vidros influenciam o índice de refração e o coeficiente de expansão.

O ácido bórico é também usado como adstringente, anti-séptico e desinfetante de moderada toxicidade, além de ser empregado no recobrimento de madeiras para a proteção contra as intempéries, na prevenção de incêndios e como agente antifúngico<sup>(7)</sup>.

Por apresentar propriedades de desinfetante, o bórax é usado como componente para assepsia bucal<sup>(2)</sup>.

O boro não é considerado tóxico, porém a assimilação de seus compostos pode apresentar um efeito cumulativo nos seres humanos<sup>(1)</sup>. A ingestão acidental de ácido bórico tem sido a causa de envenenamento fatal em crianças. A dose letal estimada para adultos é de 15 a 20 gramas<sup>(2,7)</sup> do ácido.

O elemento boro se encontra distribuído por todos os tecidos e órgãos dos seres vivos em concentrações baixas e algumas vezes nos ossos. Entretanto não se conhece sua função nos organismos dos animais<sup>(8)</sup>. Como tentativa de se descobrir a função deste elemento nos animais, administraram dietas ricas e deficientes de boro em cobaias, que se desenvolveram e se reproduzi-

ram normalmente, não evidenciando portanto qualquer efeito notável<sup>(8)</sup>.

Apesar de não se ter estabelecido ainda nenhuma função deste elemento nos organismos dos animais, estudos recentes têm indicado a necessidade do boro como nutriente essencial ao crescimento das plantas. Sua essencialidade está estritamente relacionada a atividade dos meristemas<sup>(9)</sup>.

Se por um lado o boro é, aparentemente, bem tolerado pelos animais, o excesso ou deficiência deste elemento causa sérios danos às plantas, podendo comprometer gravemente a produtividade de uma cultura. A faixa de concentração do boro nas plantas é da ordem de alguns microgramas por grama (ppm)<sup>(10)</sup>, com um intervalo de concentração relativamente pequeno entre níveis considerados deficiente e tóxico.

Assim sendo, a análise química de plantas e solos tem um papel de extrema importância no controle da produtividade de uma determinada cultura. Para este controle é necessário um grande número de análises. Deste forma, os laboratórios necessitam de processos rápidos, simples, confiáveis e de baixo custo, de modo a viabilizar um controle contínuo e adequado do conteúdo de boro nestas matrizes.

Considerando-se os diversos métodos de determinação de boro em plantas já descritos na literatura, o espectrofotométrico<sup>(1)</sup> tem sido o mais utilizado em trabalhos de rotina.

Dentre os métodos espectrofotométricos, os procedimentos que utilizam o reagente colorimétrico azometina-H, se encontram atualmente em maior evidência, tanto em procedimentos estáticos convencionais como sob condições dinâmicas de análise em fluxo contínuo. Das técnicas de análise em fluxo contínuo, o método de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM), recentemente

descrito na literatura<sup>(11)</sup>, mostrou ser potencialmente útil na de terminação de boro, razão pela qual avaliou-se a sua aplicação na análise rotineira deste elemento, usando como reagente colorimétri co a azometina-H. Os resultados obtidos resultaram nesta tese.

## CAPÍTULO II

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### II.1. IMPORTÂNCIA DO BORO NAS PLANTAS

O Homem, em comum a todos os outros animais, depende das plantas para provisão de sua alimentação. O Homem primitivo obtinha seus alimentos das plantas silvestres, diretamente pela ingestão das folhas, frutos ou raízes, ou, indiretamente, pela caça de outros animais que haviam se alimentado de plantas.

Um dos primeiros passos da civilização ocorreu quando o homem aprendeu a domesticar os animais e a cultivar as plantas.

Inicialmente as plantas eram cultivadas em um ambiente improvisado, no qual a fertilidade do solo era melhorada pela incorporação de fertilizante animal.

O rápido crescimento da população mundial acarretou uma necessidade de se aumentar a produção de alimentos básicos, de modo que passou-se a suprir os solos com nutrientes, através do uso frequente e continuado de fertilizantes químicos no lugar do fertilizante animal.

Dentre os diversos nutrientes requeridos pelos vegetais, o boro é um dos mais importante para o desenvolvimento das plantas.

Apesar de vários pesquisadores<sup>(12,13)</sup> terem comprovado, há muito tempo atrás, a existência do boro e do ácido bórico em diversas plantas, somente em 1927, o boro foi realmente considerada

do um micronutriente essencial, baseado no trabalho desenvolvido por Sommer<sup>(14)</sup>.

Todas as plantas necessitam de boro, porém apresentam consideráveis variações no que diz respeito aos níveis de deficiência e tolerância a este elemento.

A absorção do boro pelas plantas varia com o genótipo<sup>(9)</sup>. Em geral as monocotiledôneas<sup>(\*)</sup> necessitam de menor quantidade de boro do que as dicotiledôneas<sup>(\*\*)</sup>, porque estas últimas têm raízes com alta capacidade de absorção desse elemento.

A função do boro no metabolismo das plantas vem sendo estudado há mais de 70 anos e durante este tempo várias hipóteses e muita polêmica têm sido levantadas<sup>(9,10,16,17)</sup>.

Provavelmente o boro é absorvido pelas plantas como ácido bórico monomérico, não dissociado<sup>(16)</sup>, através de um processo ainda não compreendido. Existem controvérsias quanto ao tipo de mecanismo de absorção.

Nas raízes, o boro se encontra principalmente ligado nos espaços livres de água ou, reversivelmente, aos complexos de polissacarídeos, nas paredes das células<sup>(9)</sup>. Uma outra hipótese indica que a absorção do boro está relacionada a algum tipo de associação deste elemento com outros íons no substrato nutriente. Reeve e Shive<sup>(18)</sup> demonstraram que uma baixa concentração de cálcio ou potássio no substrato nutriente, causa uma baixa tolerância ao boro,

---

(\*) Monocotiledônea: planta (ou grupo de plantas) que produz flores e cujas sementes possuem um só cotilédone, que são as folhas embrionárias<sup>(15)</sup>.

(\*\*) Dicotiledônea: planta (ou grupo de plantas) que produz flores e cujas sementes possuem dois cotilédones<sup>(15)</sup>.

enquanto que as plantas com grande disponibilidade destes elementos necessitam também de maior teor de boro.

O fato do boro ser considerado essencial somente às plantas superiores, levou Rajaratnan *et alii*<sup>(16)</sup> a sugerirem que o papel principal deste elemento no metabolismo das plantas está associado à biossíntese de flavonóides<sup>(\*)</sup>. Estes compostos são encontrados apenas nas plantas superiores. Neste estudo observa-se também que as plantas com deficiência de boro apresentam acumulação de compostos fenólicos, o que indica a necessidade do boro na polimerização da lignina<sup>(\*\*)</sup>.

Entretanto é difícil conciliar todos os efeitos apresentados pela deficiência de boro com o metabolismo fenólico, particularmente quando não se observam alterações nos níveis desses compostos e a planta se encontra deficiente em boro<sup>(9)</sup>.

Uma das hipóteses mais persistentes sobre a função bioquímica do boro nas plantas, é a relação açúcar-boro, cujo papel deste elemento seria o de facilitar o transporte dos açúcares através das membranas. Esta idéia baseia-se na tendência do ácido bórico em formar complexos "*cis-dióis in vitro*"<sup>(19)</sup>, exemplificados na figura II.1.

Sugeriu-se, portanto, que o complexo açúcar-borato pode

---

(\*) Flavonóides: são compostos aromáticos que contêm oxigênio. Pigmentos distribuídos nas plantas superiores sob as cores amarela, vermelha e azul e nas flores e frutos<sup>(15)</sup>.

(\*\*) Lignina: substância que impregna a parede celulósica em certos tecidos, extremamente resistente a agentes químicos e a microorganismos e de natureza química imperfeitamente conhecida<sup>(15)</sup>.

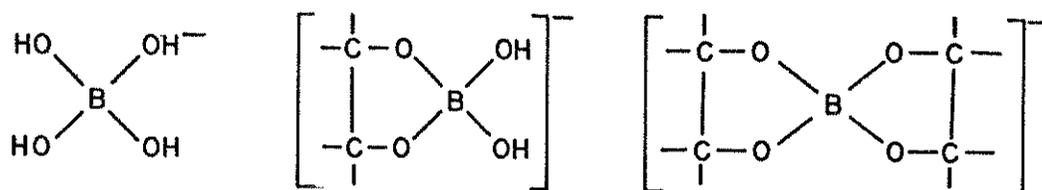


Figura II.1: Ilustração das interações tipo "cis-dióis *in vitro*" (2,19)

ser transportado através da membrana celular mais facilmente do que as moléculas de açúcar. A confirmação desta hipótese foi feita através de observação dos pontos de crescimento das plantas. Quando a nutrição de boro é adequada, observa-se um gradiente em favor da translocação do açúcar, enquanto que uma nutrição deficiente não favorece este processo (16).

Atualmente existem evidências de que a ausência de açúcares, nas folhas deficientes em boro, está mais relacionada à redução da utilização dos açúcares nos meristemas (\*) e na regulação da membrana para o transporte de açúcares através da folha, do que com a atividade do sistema de transporte em si (9).

Dentre os estudos recentes (9,20), nota-se a tendência de relacionar o boro rigorosamente à atividade dos meristemas,

(\*) Meristema: tecido vivo, não diferenciado ainda, que tem capacidade de multiplicar-se por divisão de suas células, formando outros tecido (15).

principalmente dos meristemas apicais<sup>(\*)</sup>. Sob condições de deficiência de boro, a divisão celular não se processa satisfatoriamente, o que resulta num crescimento irregular e incompleto das folhas, devido a degeneração e desorganização dos tecidos ao redor do meristema apical. Porém a causa básica deste efeito não é compreendida.

Cohen e Lepper<sup>(21)</sup> estabeleceram que os primeiros sintomas apresentados pela deficiência de boro eram a interrupção do alongamento das raízes. Esta interrupção é provavelmente causada pela ausência da divisão celular nos meristemas, provocando também, a interrupção da síntese do DNA (ácido desoxirribonucleico). Estes autores sugeriram, então, que o boro deve fazer parte de um mecanismo regulador intracelular para a divisão nos tecidos meristemáticos.

Atualmente há evidências da essencialidade do boro na fixação adequada das sementes e no desenvolvimento dos frutos, sendo que as anomalias destes são consideradas características da síndrome da deficiência de boro<sup>(9)</sup>.

Outros estudos relacionaram o boro ao metabolismo dos ácidos nucleicos, onde este elemento influencia a incorporação do fósforo junto ao RNA (ácido ribonucleico) e DNA<sup>(9)</sup>.

Nota-se que as plantas normalmente apresentam um aumento da resistência a doenças, após a aplicação de boro<sup>(9)</sup>.

Talvez a maior dúvida existente quanto à função do boro como micronutriente, resida no fato deste elemento não entrar na composição de nenhuma enzima, como ocorre com os demais nutrientes das plantas.

---

(\*) Apical: relativo ao ápice<sup>(15)</sup>.

Os primeiros estágios da deficiência do boro nas culturas não podem ser facilmente diagnosticados. Em geral, só é possível diagnosticar sua deficiência quando as plantas já se encontram bem danificadas.

Entretanto, como os sintomas associados à deficiência de boro são muitas vezes confundidos com os causados por insetos ou viroses<sup>(9)</sup>, deve-se acompanhar a cultura com análises periódicas de solo e folhas, para se comprovar a deficiência de boro e eliminar outras hipóteses.

Os sintomas externos desta deficiência aparecem em diferentes partes da planta e são encontrados em diversas espécies de cultura. As folhas mais jovens são as primeiras a serem afetadas. A falta de boro torna as folhas deformadas, espessas, quebradiças, frisadas, enrugadas, murchas e com manchas cloróticas<sup>(10)</sup>. Os pontos de crescimento apresentam necroses e a formação dos frutos é irregular, resultando em frutos deformados.

A toxicidade do boro representa um grave problema em muitas áreas de agricultura, principalmente em regiões áridas, que geralmente apresentam solos com grande conteúdo de boro. Outra área também afetada são os solos irrigados com água contendo alto teor de boro, na forma natural ou devido ao crescente uso deste elemento em materiais de limpeza e em processos industriais. Desta forma a aplicação deste elemento nos solos através de fertilizantes, torna-se bastante crítica.

Os sintomas visuais do excesso de boro apresentado pelas plantas podem ser facilmente identificados nos estágios iniciais, ao contrário dos sintomas da deficiência. O primeiro sintoma é mostrado pelo amarelamento das extremidades das folhas<sup>(10)</sup>.

A distribuição do boro nas folhas e os sintomas da toxi

cidade por este apresentado estão relacionados à venação<sup>(\*)</sup>, supondo-se que o boro é transportado pelo fluído da transpiração e concentrado nas bordas das folhas quando a água é evaporada<sup>(22)</sup>.

Nos estágios mais agudos, o excesso produz uma necrose progressiva das folhas, amarelando as extremidades e bordas e difundindo até a nervura central. As extremidades e bordas das folhas parecem queimadas e mais tarde toda a folha será envolvida até a sua queda prematura<sup>(22)</sup>.

Entretanto como estes sintomas podem ser provocados por outras causas, o diagnóstico de excesso de boro também só pode ser confirmado através da análise química das folhas e solos.

## II.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE BORO

Vários métodos têm sido propostos e descritos na literatura como adequados à determinação quantitativa de boro em diferentes matrizes. Esses diversos métodos se diferenciam quanto à faixa útil de concentração, quanto à especificidade e, finalmente, quanto à origem das amostras<sup>(2)</sup>.

Um estudo interlaboratorial, relatado por Watson<sup>(23)</sup>, indicou que as dificuldades encontradas na execução de análises de boro em comparação a outros elementos, são refletidas pela grande gama de resultados observados.

Como o interesse deste trabalho está direcionado para a

---

(\*) Venação: distribuição das nervuras nas folhas ou órgãos foliares<sup>(15)</sup>.

análise de boro em plantas, e sabendo-se que neste caso as concentrações encontradas apresentam-se, em geral, na faixa de 10 a 100 mg de boro por quilograma do material seco<sup>(2,9)</sup>, os procedimentos mais adequados e melhor aplicáveis a este tipo de determinação são, conseqüentemente, os colorimétricos e os espectrográficos<sup>(2)</sup>.

### II.2.1. Métodos Espectrográficos de Emissão

O método espectrográfico de emissão é um procedimento multielementar de análise e se baseia no fato de que cada elemento em seu estado de vapor, quando adequadamente excitado, emite um espectro característico. A excitação pode ser feita, principalmente, através de chama, de arco ("arc") e de centelha ("spark"), dentre outras. A radiação emitida é analisada em um espectrógrafo, considerando-se os comprimentos de onda característicos dos componentes de interesse. O registro do espectro pode ser feito fotograficamente ou fotoeletricamente.

As linhas espectrais são propriedades de cada átomo e não são afetadas pelo estado físico inicial ou combinação química dos átomos. A posição das linhas espectrais indicam qualitativamente quais os elementos presentes na matriz analisada, enquanto que a intensidade determina a quantidade de cada um dos elementos.

O método espectral é adequado a medidas de pequenas quantidades de boro. Em geral apresenta boa sensibilidade (cerca de 0,1 ppm), numa faixa de 10 a 50 ppm de boro em peso<sup>(2)</sup>. O boro apresenta um espectro dos mais simples e possui somente duas linhas de emissão espectralmente úteis: o dublete em 2496,778 Å e 2497,733 Å<sup>(2)</sup>.

Mathis em 1953<sup>(24,25)</sup> foi oficialmente o primeiro a uti

lizar o procedimento espectrográfico de excitação por centelha para a determinação simultânea de 13 elementos, inclusive o boro, em cinzas de plantas. Entretanto, em 1948, Smith *et alii*<sup>(26)</sup> já haviam empregado o método espectrográfico, por excitação com arco de corrente contínua na análise de boro, com estimativas quanto às concentrações de potássio, magnésio e manganês.

A leitura direta da emissão por excitação por centelha, é algumas vezes limitada ao tipo de amostra (se sólida ou líquida) e, em análises multielementares, a concentração de outros elementos, pode ser alterada durante o processo de excitação.

Os métodos espectrográficos de emissão são, geralmente, mais rápidos e menos afetados por interferentes que os colorimétricos. Porém, a precisão e a exatidão deste método, que podem chegar a 10% nos procedimentos quantitativos, são em muitos casos inferiores ao colorimétrico, dependendo do elemento e da sua concentração na matriz analisada<sup>(2)</sup>.

O ferro, que apresenta a linha de emissão em  $2497,82 \text{ \AA}$ <sup>(2)</sup>, portanto muito próxima das linhas do boro ( $2496,778$  e  $2497,733 \text{ \AA}$ ), provoca uma séria interferência na determinação deste elemento. Desta forma torna-se necessário, na maioria das vezes, a remoção prévia do ferro nas amostras contendo boro.

Recentemente a espectroscopia de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) tem sido usada em determinações de boro em plantas e solos, apresentando bons resultados<sup>(27,28)</sup>. Esse sistema de emissão em plasma é bem mais adaptável ao uso em análise de amostras de diferentes matrizes, apresentando uma faixa de concentração linear mais larga, que facilita tanto a análise em concentrações altas como baixas, de um mesmo elemento<sup>(28)</sup>.

## II.2.2. Métodos Colorimétricos Convencionais

Há pelo menos 40 anos, uma grande quantidade de pesquisas têm sido feitas no sentido de se desenvolver reagentes mais sensíveis e específicos para a determinação espectrofotométrica de boro.

A escolha de um reagente colorimétrico específico é determinada por uma série de fatores como: a sensibilidade apresentada, a facilidade de manipulação, a interferência de outros elementos e o conhecimento das condições ótimas para o melhor desenvolvimento da cor.

A maioria dos métodos colorimétricos usados na detecção e determinação de boro se baseia na formação de um complexo colorido, produto de uma reação entre o ácido bórico e um reagente orgânico. Este reagente orgânico é, geralmente, um ligante bidentado com grupos hidroxila de caráter alcoólico, fenólico ou enólico<sup>(2)</sup>.

Alguns desses reagentes devem ser destacados, devido à difusão que seus métodos alcançaram nos procedimentos de rotina, como o azul de metileno, a quinalizarina, a curcumina e a azometina-H.

Goward e Wiederkehr<sup>(29)</sup> analisaram diversos reagentes colorimétricos (exceto a azometina-H) quanto à sensibilidade e outras propriedades, concluindo que o reagente azul de metileno (tetrametiltionina) apresenta maior sensibilidade na determinação de boro que os demais.

#### - MÉTODO DO AZUL DE METILENO

Este método consiste na formação de um complexo íon-associado entre o ácido fluorobórico ( $\text{HBF}_4$ ) e o reagente. O complexo é extraído com um solvente orgânico e então medido colorimetricamente a 658 nm<sup>(2)</sup>. A maior desvantagem deste procedimento está na utilização dos ácidos sulfúrico e fluorídrico concentrados, precursores da espécie  $\text{HBF}_4$ . Outra desvantagem que levou ao abandono deste método, foi a baixa reprodutibilidade obtida<sup>(9)</sup>.

#### - MÉTODO DA QUINALIZARINA

A quinalizarina (1,2,5,8-tetra-hidroxian-traquinona) foi considerada por Goward e Wiederkehr<sup>(29)</sup> como o reagente mais adequado à análise de boro, por possuírem um grande número de informações sobre as melhores condições de reação.

A dissolução da quinalizarina é feita em ácido sulfúrico concentrado com a produção de uma coloração violeta azulada, e quando em presença de ácido bórico, com aquecimento, ocorre a formação de um complexo azul. A figura II.2 mostra a reação entre a quinalizarina e o ácido bórico. O solvente, neste caso o ácido sulfúrico concentrado, funciona como agente desidratante, fazendo com que esta reação de esterificação se complete.

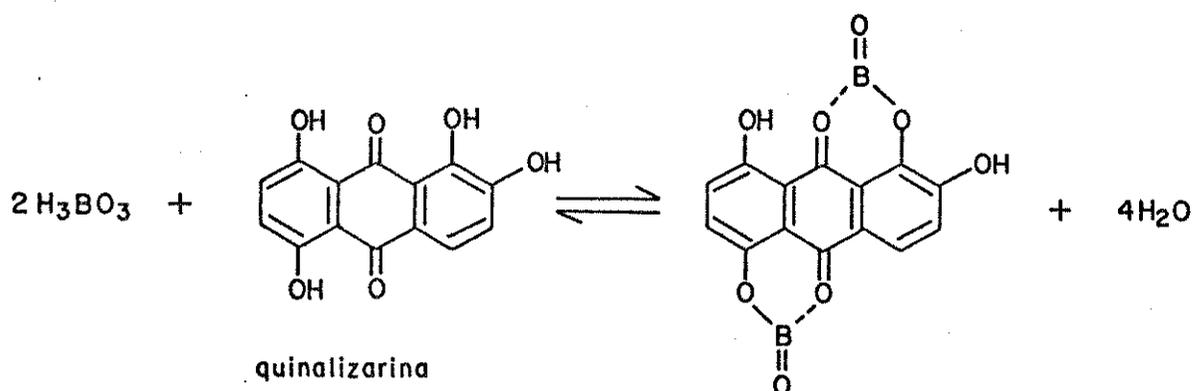


Figura II.2: Reação entre o ácido bórico e a quinalizarina.

As desvantagens apresentadas por este método são os desvios da lei de Beer, a sobreposição dos espectros do reagente e do complexo boro-quinalizarina, e a sensibilidade do aduto à água<sup>(29)</sup>. A sensibilidade deste procedimento pode sofrer alterações dependendo da concentração do ácido sulfúrico, usado como desidratante. Tipicamente, o limite de detecção desta técnica é cerca de  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de boro numa faixa de 0 a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de boro. Os íons de metais de transição, os nitratos, o íon fluoreto e os agentes oxidantes são interferentes.

O método da quinalizarina encontra-se descrito na literatura como o método oficial de análise no AOAC Official Methods of Analysis (1984)<sup>(30)</sup> para a determinação de boro em plantas.

## - MÉTODO DA CURCUMINA

O reagente curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), cuja fórmula estrutural está descrita na figura II.3, é um corante natural que pode ser obtido por extração da planta "*Curcuma tintora*", ou por síntese<sup>(31)</sup>. A curcumina é um dos reagentes mais antigos usados na determinação de boro, e apareceu pela primeira vez na literatura em 1902<sup>(2)</sup>.

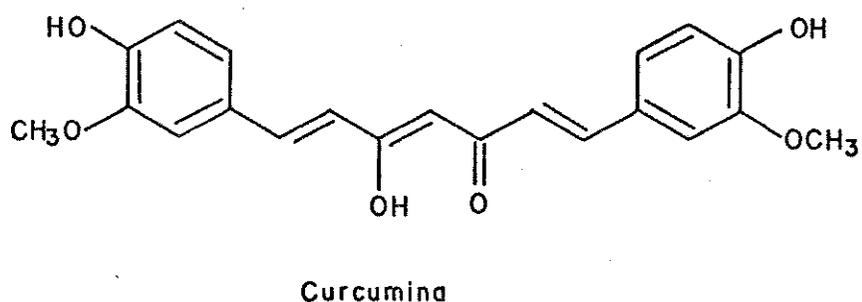


Figura II.3: Fórmula estrutural da curcumina<sup>(2)</sup>

Os métodos que usam a curcumina como reagente colorimétrico podem ser divididos em dois grupos: o que usa o complexo rubrocurcumina e o do complexo rosocianina. Ambos os complexos apresentam uma coloração vermelha visualmente indistinguível, mas são quimicamente distintos como mostra a figura II.4.

O complexo rubrocurcumina é formado pela reação entre o ácido bórico, ácido oxálico e a curcumina, em ácido acético. Este complexo é extremamente sensível à umidade, provocando uma falta de reprodutibilidade do método.

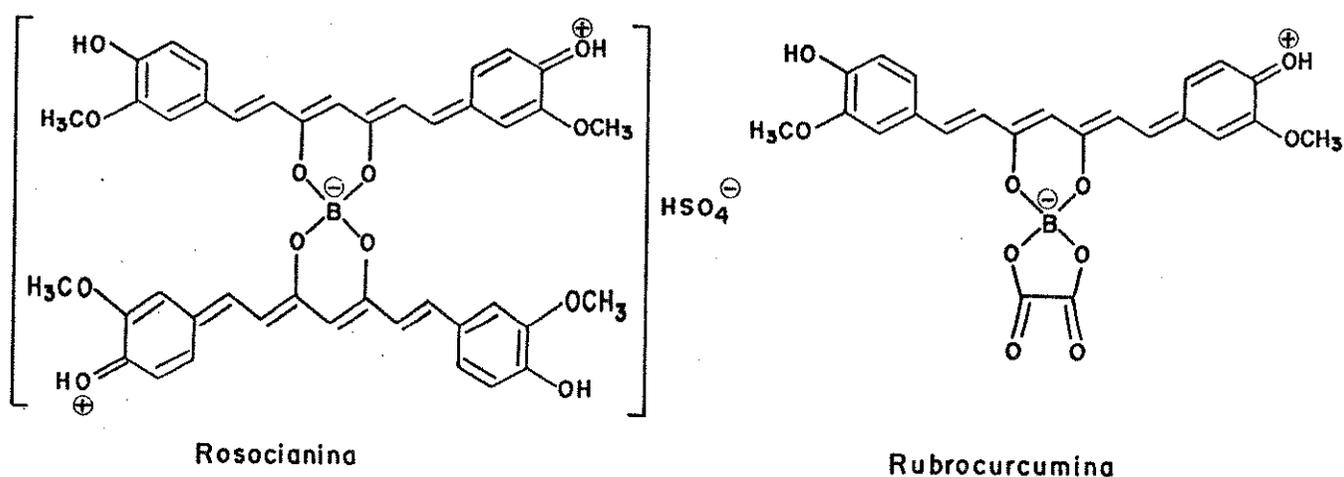


Figura II.4: Fórmulas estruturais dos complexos rosocianina e rubrocurcumina<sup>(32)</sup>.

A rosocianina é formada em solução fortemente ácida e praticamente isenta de água. Este complexo é mais estável que a rubrocurcumina, e apresenta uma alta absorvidade molar, aproximadamente duas vezes a da rubrocurcumina, tornando-o assim, mais adequado à análise de boro.

A grande polêmica existente na literatura em relação a estes complexos, levou à denominação de ambos como "complexo boro-curcumina"<sup>(9)</sup>.

Dible *et alii*<sup>(31)</sup> compararam o método da curcumina ao da quinalizarina. Segundo estes autores, a curcumina apresenta maior sensibilidade ao boro, além de não utilizar agentes corrosivos

vos, como no caso da quinalizarina. Porém o método da curcumina é susceptível às interferências do ferro, molibdênio, titânio, nióbio, tântalo, zircônio, que também formam um complexo de coloração avermelhada em contato com o reagente. Agentes oxidantes como peróxido, cromato, permanganato, nitrito e perclorato podem evitar ou retardar o desenvolvimento da cor. Para contornar esses problemas, Wikner<sup>(33)</sup> fez uma extração prévia do boro utilizando o reagente 2,2-dimetil-1,3-hexanodiol.

As dificuldades práticas encontradas na execução deste procedimento ocasionam, invariavelmente, uma falta de reprodutibilidade e conseqüentemente perda de exatidão do método.

Uppström<sup>(32)</sup> propôs uma modificação no método da curcumina, na tentativa de obter uma melhor reprodutibilidade. Este autor optou pela complexo rosocianina por ser mais estável com relação a hidrólise e por possuir maior absortividade molar. A primeira etapa deste procedimento é a remoção da água usando anidrido propiônico. A solução resultante é mais homogênea, necessitando de um menor tempo de reação. A exatidão obtida é maior, provavelmente porque os processos exaustivos, como a evaporação, são desnecessários. Na segunda etapa, faz-se a destruição do complexo protonado interferente, usando um tampão adequado e em seguida, procede-se às medidas espectrofotométricas do complexo rosocianina.

#### - MÉTODO DA AZOMETINA-H

A azometina-H, cuja estrutura química está descrita na figura II.5, é atualmente o reagente mais utilizado nas determina

ções do boro, em diferentes matrizes.

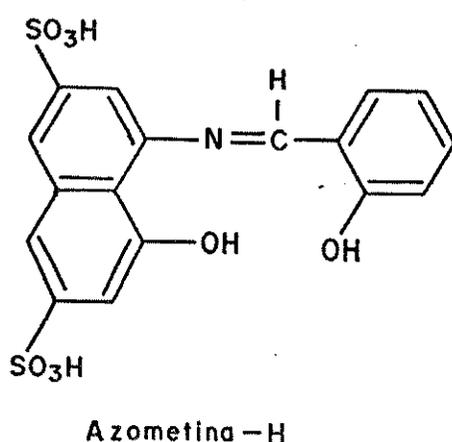


Figura II.5: Fórmula estrutural da azometina-H

As reações e propriedades da azometina-H na determinação de boro foram inicialmente estudados por Capelle<sup>(34)</sup> em 1961. Este autor comparou-a a outros reagentes contendo os grupos imina e azo em meio aquoso. Os reagentes, que contêm o grupo azo, são comumente denominados de Reagentes de Korenmann<sup>(35)</sup>. Dentre estes, Capelle considerou a azometina-H como o melhor reagente colorimétrico para a determinação de boro.

O reagente azometina-H é o produto da condensação entre o ácido 4-amino-5-hidroxi-2,7-naftalenodissulfônico (ácido-H) e o aldeído salicílico. Em solução aquosa a azometina-H se apresenta com uma coloração amarela e se dissocia segundo o esquema mostrado na figura II.6. Quando em presença de ácido bórico o equilíbrio descrito na figura II.6 se desloca da direita para a esquerda, na direção da formação da azometina-H, intensificando a cor amarela. Em resumo, o ácido bórico se comporta como um catalisa-

dor da reação de formação da azometina-H<sup>(34)</sup>.

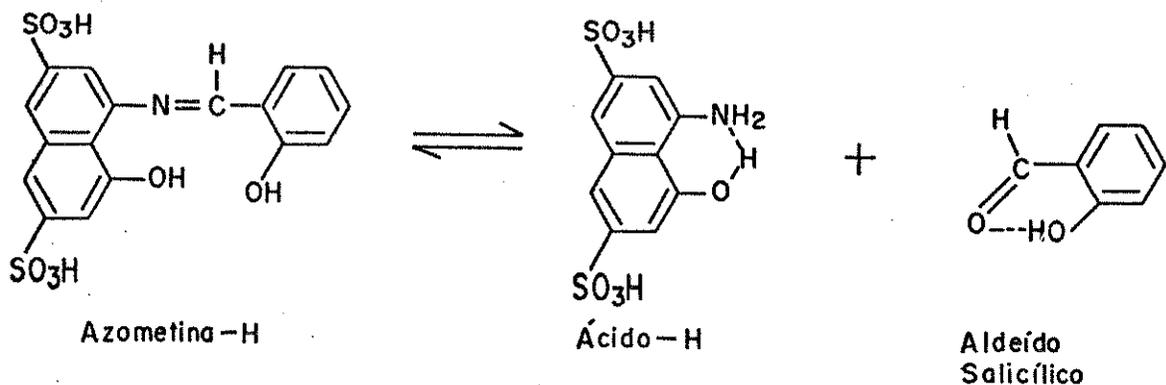


Figura II.6; Reação de dissociação da azometina-H em solução aquosa<sup>(34)</sup>.

Uma das vantagens mais importantes deste método é que a reação se processa em meio aquoso, o que proporciona maior simplicidade e rapidez na execução da análise, além de apresentar boa sensibilidade. Este procedimento está sujeito a um menor número de interferentes, quando comparado aos demais métodos anteriormente descritos. Entretanto a azometina-H é um reagente instável e deve ser cuidadosamente estocado.

Dentre os primeiros procedimentos convencionais estáticos usando o reagente azometina-H, foi o proposto por Capelle<sup>(36)</sup> em 1961, para a determinação de boro em ligas de aço. Posteriormente Shanina *et alii*<sup>(37)</sup> fizeram um estudo sobre as melhores condições de análise usando este método para a determinação de boro em compostos orgânicos, como boranos e borenos.

Uma revisão de métodos colorimétricos para a determina

ção de boro em plantas, solos e soluções nutritivas feita por Wolf<sup>(38)</sup>, mostrou que a azometina-H é o reagente preferido aos demais, devido a relativa simplicidade e exatidão do método. Em sequência, Wolf<sup>(39)</sup> acrescentou melhoramentos ao seu método original, descrito anteriormente. Estes dois trabalhos são os precursores para a análise de boro em plantas, usando a azometina-H.

John *et alii*<sup>(40)</sup> verificaram a necessidade de mais estudos sobre as melhores condições experimentais da reação entre a azometina-H e o boro, tais como os fatores que afetam o desenvolvimento da cor e a tolerância do procedimento a interferentes iônicos, comumente encontrados nas plantas.

Uma comparação entre o método desenvolvido por John *et alii*<sup>(40)</sup> e o método usando o reagente carmina<sup>(41)</sup> foi feita por Sippola e Erviö<sup>(42)</sup>. Estes autores obtiveram resultados similares para os extratos de plantas e de solos analisados.

Gaines e Mitchell<sup>(43)</sup> em 1979 propuseram uma nova técnica para a extração do boro em plantas e desta forma, tornou-se necessário estudar novamente as melhores condições de reação entre o boro e a azometina-H. Os resultados encontrados foram compatíveis com os obtidos usando padrões certificados.

#### - OUTROS MÉTODOS

Alguns outros reagentes têm sido recentemente empregados na determinação espectrofotométrica de boro, tais como o cristal violeta<sup>(44)</sup> e o ácido 8-hidroxi-1-(2-hidroxi-1-naftilmetilenoamino)naftaleno-3,6-dissulfônico<sup>(45)</sup>. Este último é um composto derivado da azometina-H, mas sua interação com o boro se processa

de modo diferente. Ambos os métodos apresentam alta sensibilidade, porém as condições experimentais são difíceis, exaustivas e lentas, além de sofrer a ação de um número maior de interferentes.

### II.2.3. Métodos em Fluxo Contínuo

Atualmente os métodos automáticos<sup>(\*)</sup> são utilizados pela maioria dos laboratórios de análise, isto porque a análise química vem sendo cada vez mais usada como suporte técnico em diversas áreas, tais como a produção industrial e agrícola, a medicina, a qualidade do meio ambiente, dentre outras. Os fatores mais significativos que contribuíram para o desenvolvimento dos métodos automáticos foram a economia e a rapidez dos resultados obtidos.

Dentre os analisadores automáticos, o analisador de fluxo contínuo se encontra atualmente em maior destaque nos laboratórios de análise<sup>(46)</sup>. A análise em fluxo contínuo se refere ao processo no qual a concentração da espécie a ser analisada é medida ininterruptamente num líquido carregador e pode ser dividida em análise em fluxo contínuo segmentado (AFCS) e análise em fluxo contínuo não segmentado.

#### - Análise em Fluxo Contínuo Segmentado

A análise em fluxo contínuo segmentado (AFCS) foi origi

---

(\*) A distinção entre métodos analíticos automáticos e mecanizados é discutida brevemente no Apêndice 1.

nalmente desenvolvida para análises clínicas, devido ao crescente número e às variedades de determinações nesta área. Esta técnica foi introduzida por Skeggs<sup>(47)</sup> em 1957, para a determinação de uréia e glicose no sangue com um equipamento que resultou nos sistema "AutoAnalyzer" fabricado comercialmente pela Technicon Corp.. Estes autoanalisadores são considerados os mais populares.

Após o desenvolvimento deste sistema ("AutoAnalyzer") uma grande variedade de métodos automatizados de análise surgiram, ou por adaptações dos procedimentos manuais já existentes ou por técnicas inteiramente novas.

No sistema de fluxo contínuo segmentado, as amostras, que estão dispostas em recipientes individuais de uma bandeja amostradora, são sucessivamente aspiradas e transportadas por uma bomba peristáltica, através do sistema. Entre uma amostra e outra há necessidade de se aspirar um fluído de lavagem, para se evitar possíveis intercontaminação entre as mesmas. O fluído resultante da amostra é então regularmente segmentado por bolhas de ar, as quais são liberadas por outro tubo de bombeamento. Posteriormente, os reagentes são adicionados a cada segmento de amostra. Durante o percurso é possível proceder uma série de etapas analíticas reprodutíveis e totalmente automatizadas, tais como a diluição precisa da amostra, a adição quantitativa de outros reagentes e processos de diálise, além de ser possível controlar outras variáveis importantes, como o tempo e temperatura de uma reação.

A mistura da amostra com os diluentes e reagentes são feitas na análise em fluxo contínuo através de movimentos naturais dos fluídos, ou seja uma microcirculação, que ocorrem devido à interface líquido-gás existente nas extremidades de cada pequeno segmento líquido. A difusão das amostras será limitada, evidentemente, pelo tamanho do arranjo de fluxo e pela vazão resul

tante.

As bolhas de ar devem ser removidas antes da detecção, porque a passagem das mesmas através da cela de fluxo acarreta sinais indesejáveis no registro das medidas. A remoção destes segmentos de ar é feita por bombeamento diferencial, onde a vazão de entrada é maior que a vazão que passa pela cela de fluxo. Desta maneira os segmentos de ar são descartados através de um tubo em confluência a  $90^\circ$ , reconstituindo-se assim em fluxo contínuo. Esta remoção, acompanhada por um tempo suficientemente longo de amostragem, ocasiona um estado estacionário. O estado estacionário é obtido quando a concentração da espécie a ser determinada se torna constante durante um certo período de tempo.

Nos autoanalisadores tipo "AutoAnalyser III" as leituras são diretas<sup>(48)</sup>, isto é, as bolhas de ar passam através da cela de fluxo, necessitando portanto o uso de circuitos eletrônicos razoavelmente sofisticados para eliminar as interferências causadas pelas mesmas.

A resposta do detector é registrada geralmente em um registrador potenciométrico. Um sistema simples de análise em fluxo multissegmentado e uma curva típica estão representados na figura II.7.

A segmentação nos analisadores de fluxo contínuo tem como objetivo a redução da dispersão longitudinal das amostras ao longo do sistema, preservando assim a identidade de cada amostra.

As curvas resultantes de um sistema de fluxo segmentado se apresentam aproximadamente como uma curva de distribuição de Gauss. Desta forma, procurou-se selecionar a dispersão com o desvio padrão ( $\sigma_t$ ), cujos valores são medidos em segundos, de uma curva Gaussiana apropriada. Avaliou-se portanto, os valores de  $\sigma_t$  em função de todas as variáveis experimentais e a relação en-

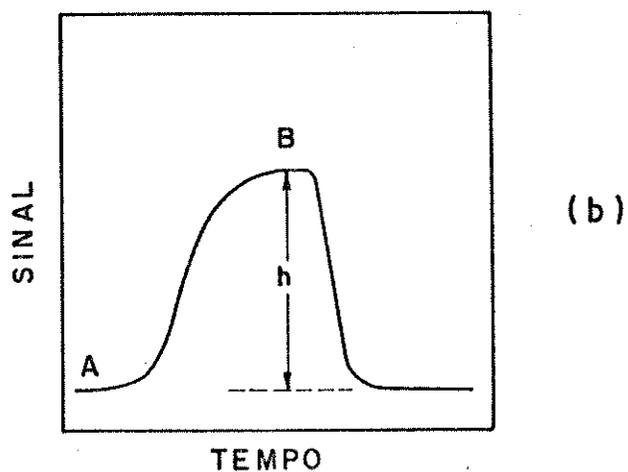
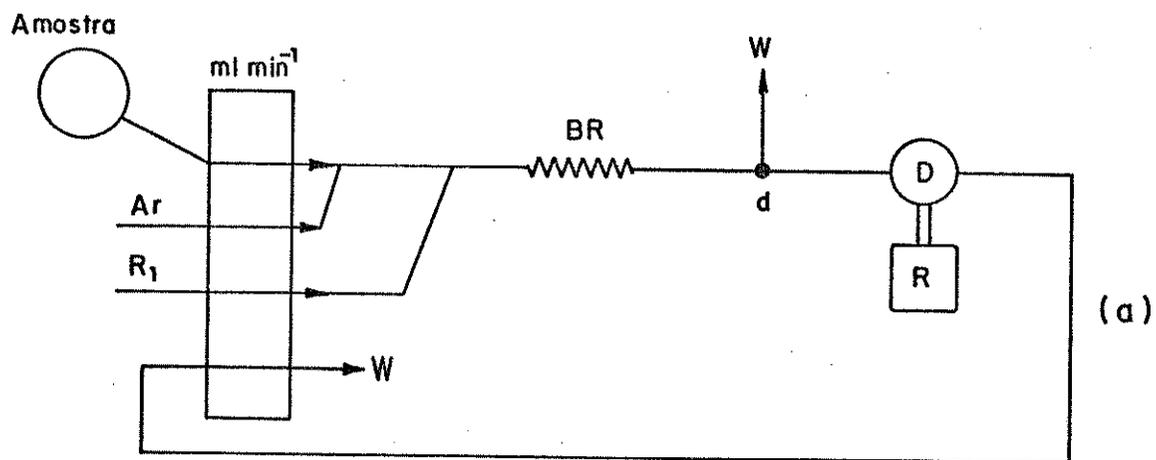


Figura II.7: (a): Sistema simples de análise em fluxo contínuo segmentado (AFCS).  $R_1$ , reagente. BR, bobina de reação. d, sistema eliminador de bolhas. D, detector. R, registrador.

(b): Registro típico da técnica de AFCS. A, linha base.  $h$ , altura do pico. B, estado estacionário.

contrada<sup>(49)</sup> está descrita a seguir pela seguinte fórmula:

$$\sigma_t^2 = \left[ \frac{538 d_t^{2/3} (F + 0,92 d_t^3 n)^{5/3} \eta^{7/3}}{\gamma^{2/3} F D_{w,25}} + \frac{1}{n} \right] \left[ \frac{2,35 (F + 0,92 d_t^3 n)^{5/3} \eta^{2/3} t}{\gamma^{2/3} F d_t^{4/3}} \right]$$

onde  $\sigma_t^2$  é a variância;  $d_t$  o diâmetro interno do tubo (em cm) pelo qual flui a amostra;  $F$  é a vazão ( $\text{ml.s}^{-1}$ ) do fluído no sistema;  $n$ , a frequência de segmentação ( $\text{bolhas.s}^{-1}$ );  $\eta$ , a viscosidade da solução fluente (em Poise);  $\gamma$ , é a tensão superficial da solução do fluído ( $\text{dina.cm}^{-1}$ );  $t$ , o tempo usado por um dado segmento desde a sua injeção no sistema até a detecção (s);  $D_{w,25}$ , coeficiente de transferência de massa variável entre  $2 \times 10^{-5}$  e  $12 \times 10^{-5}$  para espécies de peso molecular de 400.000 a 27<sup>(49)</sup>.

Snyder e Adler<sup>(50)</sup> desenvolveram um modelo ideal para descrever a dispersão da amostra durante o fluxo segmentado através do tubo aberto. Neste modelo assume-se que, a concentração da amostra em um dado segmento líquido é uniforme e constante durante todo o tempo, isto é, a mistura no segmento é infinitamente rápida. A dispersão da amostra ocorre porque o segmento líquido normalmente umedece as paredes do tubo formando um filme líquido que segue cada segmento pelo tubo. Desta forma ocorre uma transferência de líquido de um segmento para outro, ocasionando a difusão de um segmento para os seguintes, ou seja a dispersão da amostra ao longo do tubo.

Estes autores também desenvolveram um modelo não ideal<sup>(51)</sup> que é consistente com os dados experimentais dos estudos das variáveis mais relevantes e, assim, uma possível estimativa da dispersão é obtida com razoável exatidão.

Como efeito de uma dispersão excessiva tem-se a interação entre amostras diferentes formando uma sobreposição no regis-

tro das amostras adjacentes, alterando a concentração aparente de ambas. Este efeito pode ser contornado com o aumento do tempo de lavagem entre as amostras, mas isto resulta em uma queda na velocidade de determinações.

A determinação de boro usando o reagente azometina-H para análise de plantas foi automatizada por Basson *et alii*<sup>(52)</sup> em 1969, que propuseram um procedimento de rotina envolvendo um equipamento Technicon "AutoAnalyzer" padrão. Esses autores investigaram os possíveis reagentes específicos e sensíveis ao boro para o desenvolvimento dos processos automatizados. Reagentes como quinizarina e carmina exigem ácido sulfúrico concentrado e o método da curcumina necessita da evaporação a secura e extração do resíduo. Estes fatores são conseqüentemente limitantes para processos automatizados. A azometina-H foi, então sugerida como o reagente mais adaptável a automação.

Neste mesmo trabalho também investigou-se as possíveis fontes de interferências. Dentre os diversos íons estudados, apenas ferro, cobre e alumínio influenciaram a determinação do boro. Assim vários agentes complexantes foram testados, como ácido tioglicólico, cianeto, oxalato, citrato e finalmente EDTA (ácido etilenodiaminotetracético - sal dissódico). Concluíram que o EDTA era o mais efetivo agente complexante para remoção simultânea dos interferentes naquelas condições experimentais.

Posteriormente Basson *et alii*<sup>(53)</sup> (1974) descreveram um procedimento onde o reagente colorimétrico azometina-H é preparado "*in situ*", num sistema em fluxo contínuo e, em seqüência, usado na determinação de boro em solução aquosa. O sistema multissegmentado foi montado em um equipamento Technicon "AutoAnalyzer II".

Também usando esse mesmo equipamento, Porter *et alii*<sup>(54)</sup>

acoplaram um dialisador, com o intuito de remover a possível coloração dos extratos, com um menor consumo de tempo.

Procedimentos automáticos para a determinação de boro, usando reagentes como a quinalizarina e a carmina, que necessitam de ácido sulfúrico concentrado, podem ser encontrados na literatura<sup>(55,56)</sup>, entretanto é imprescindível, em ambos os casos, o uso de tubos de bombeamento resistentes a ácidos concentrados, conhecidos como tubos "Acidflex".

Ostling<sup>(57)</sup> automatizou o método da curcumina modificado, proposto por Uppström<sup>(32)</sup>, usando um equipamento automático comercialmente conhecido como "Autolab", similar ao sistema "Auto Analyzer".

Ogner descreveu um método fluorimétrico automático para a determinação de boro em plantas<sup>(58)</sup> e em extratos de solo e águas<sup>(59)</sup>, usando um sistema "AutoAnalyzer". O reagente empregado foi um complexo fluorescente com o boro em pH 7, cuja excitação e medida são feitas em 470 e 585 nm, respectivamente.

#### - Análise em Fluxo Contínuo não Segmentado

A técnica de análise em fluxo contínuo não segmentado é conhecida como análise por injeção em fluxo (AIF). Esta metodologia surgiu de algumas modificações do sistema segmentado<sup>(60,61)</sup> e foram disseminadas graças ao trabalho pioneiro do grupo de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear Aplicado a Agricultura (CENA), dirigido pelo Prof. Henrique Bergamin Filho<sup>(62)</sup>.

A análise por injeção em fluxo se baseia na injeção da amostra em um fluido carregador com vazão não-segmentada. A inje

ção em si era inicialmente feita através de seringas, mas atualmente este sistema foi substituído por injetores. O mais versátil deles é o injetor tipo proporcional<sup>(63)</sup>, também desenvolvido no CENA.

Em um sistema de análise por injeção em fluxo (AIF), pequenas quantidades de amostras são introduzidas no fluído carregador, que pode ser o próprio reagente, e é então transportada até a cela de fluxo contida em um detector, onde o sinal obtido é posteriormente registrado. Geralmente para a propulsão dos líquidos são usadas bombas peristálticas ou a própria força gravitacional<sup>(64)</sup>.

Nesta técnica, bobinas de reação são empregadas para provocar a mistura entre o(s) reagente(s) e a amostra, com consequente desenvolvimento da reação, quando for o caso.

Os detectores mais comuns utilizados em conjunto com a técnica de AIF são os espectrofotômetros, os potenciômetros e os entalpímetros, mas qualquer outro aparelho capaz de medir parâmetros físicos podem ser igualmente empregados<sup>(65)</sup>. O detector é geralmente acoplado a um registrador ou a um circuito retentor de pulso<sup>(48)</sup>, para registro dos sinais.

Um esquema básico do sistema de AIF está descrito na figura II.8(a), juntamente com um registro típico, obtido por um espectrofotômetro, como apresentado na figura II.8(b). Os sinais, quando medidos em absorbância, são geralmente registrados como picos, onde a altura  $H$  é diretamente proporcional a concentração da espécie a ser determinada.

Nos sistemas de AIF a zona de amostra dispersa-se no fluxo carregador desde a injeção até o ponto de detecção. Esta dispersão é decorrente do fluxo laminar, onde a velocidade do fluído no centro do tubo aberto e reto é maior que nas paredes do

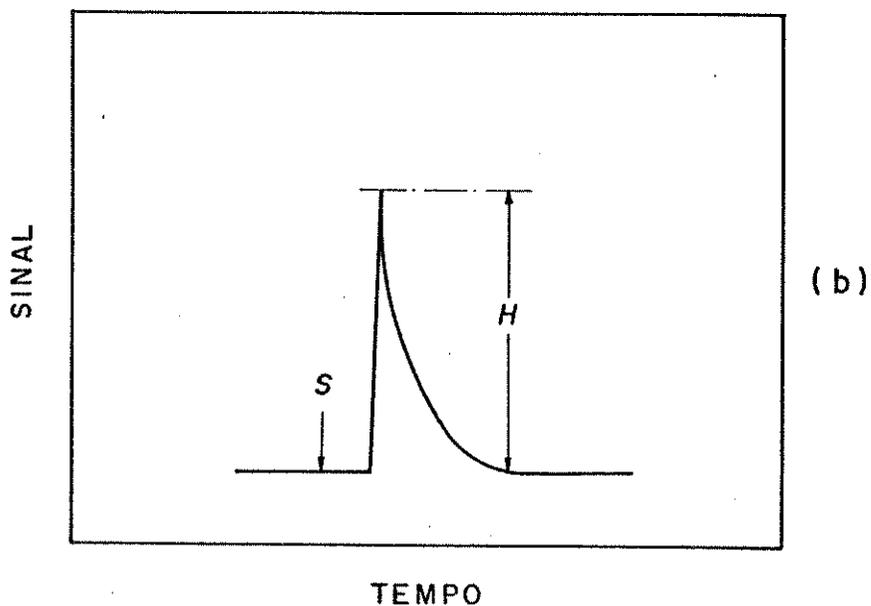
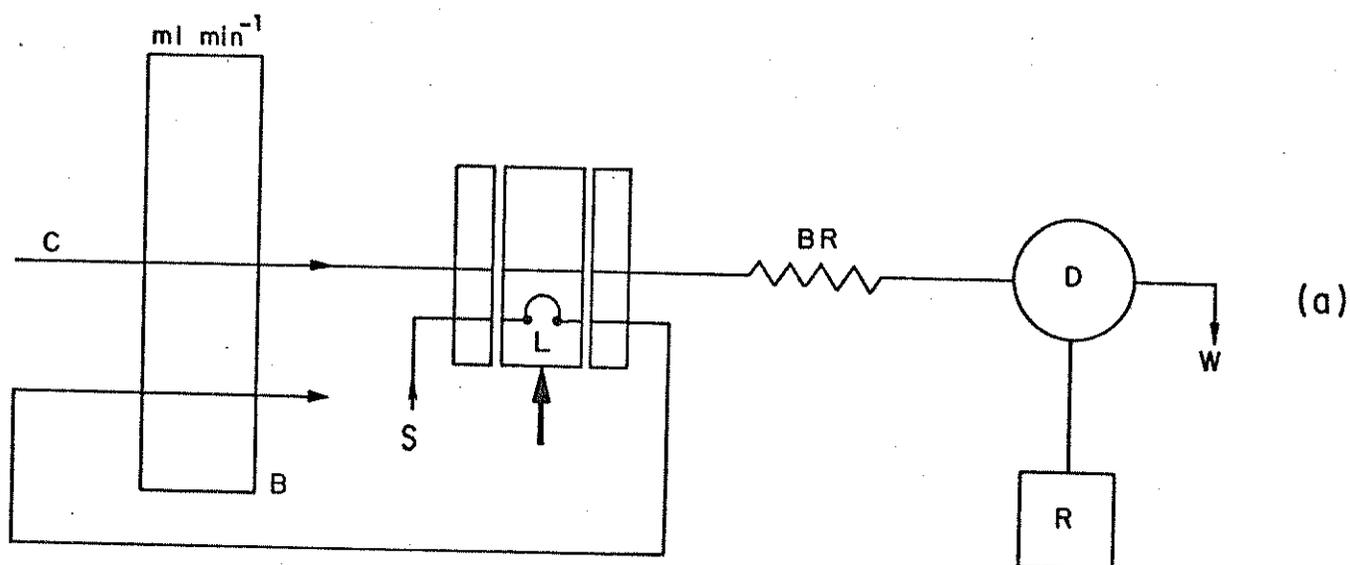


Figura II.8(a): Sistema simples de Análise por Injeção em Fluxo (AIF). C, linha do reagente. B, bomba peristáltica. L, amostrador.

(b): Sinal típico obtido em AIF. H, altura do pico. S, ponto de injeção.

tubo. Conforme a zona de amostra se desloca dentro do fluido a dispersão é inicialmente controlada por convecção e na parte final por difusão radial.

Para os propósitos da AIF, a dispersão  $D$  é definida por Ruzicka e Hansen<sup>(65)</sup> como sendo a razão entre a concentração da espécie a ser determinada sem diluição (sistema tipo "volume infinito") e a concentração desta mesma espécie após a diluição na linha, sob as condições dinâmicas da AIF, conforme a descrição da figura II.9. A dispersão  $D$  pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$D = \frac{C_0}{C_{\max}}$$

onde  $C_0$  é a concentração original da espécie e  $C_{\max}$  é a concentração da espécie medida após a dispersão da espécie na linha. Quando o sinal registrado é obtido em unidades de absorvância, pode-se também definir a dispersão  $D$  como:

$$D = \frac{H_0}{H}$$

onde  $H_0$  é a altura de  $C_0$  e  $H$  é a altura do  $C_{\max}$

A dispersão é um fator de grande importância nesta técnica e está diretamente relacionado à sensibilidade do método, podendo ser afetada e contornada por diversos fatores. Quanto maior o volume injetado da amostra se observa uma maior sensibilidade e, conseqüentemente, uma menor dispersão. Um fator que proporciona um aumento da dispersão é o aumento da vazão do fluido carregador. O aumento do caminho entre o ponto de injeção da amostra e o detector, também promoverá um acréscimo na dispersão.

As reações que apresentam uma cinética lenta necessitam

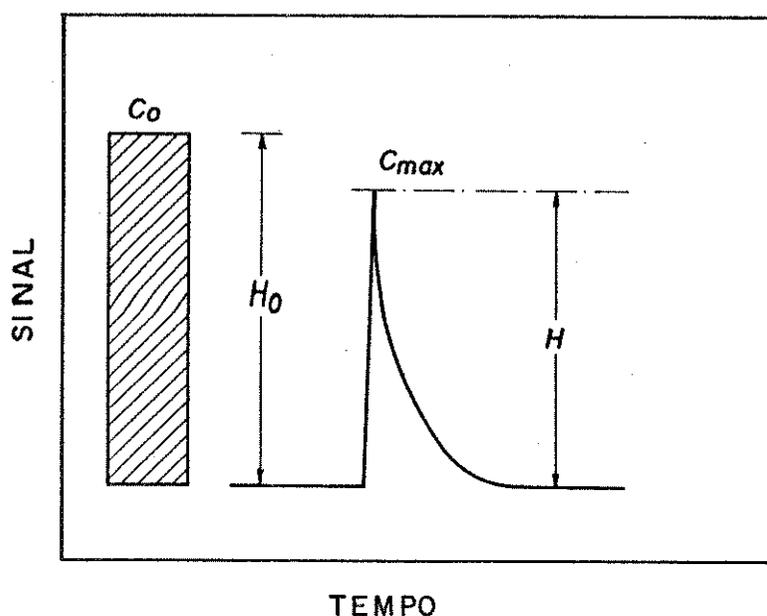


Figura II.9: A definição de dispersão  $D$ .  $C_0$ , concentração original da espécie ("volume infinito").  $C_{\max}$ , concentração da espécie no detector, sob as condições da AIF.  $H$  e  $H_0$ , alturas dos picos  $C_{\max}$  e  $C_0$ , respectivamente<sup>(65)</sup>. Sinais obtidos em unidades de absorbância.

evidentemente de um caminho maior, o que provocará uma queda na sensibilidade das medidas.

A técnica de AIF apresenta, portanto, dificuldades em conciliar a velocidade de determinação, o tempo de residência e a sensibilidade do método, quando uma reação de cinética lenta deve ser empregada em um processo analítico<sup>(48)</sup>. Aparentemente,

apenas com o uso da técnica da parada de fluxo (Stopped-flow)<sup>(66)</sup>, pode-se conciliar alta sensibilidade com tempos de residência longos, mas o número de determinações por unidade de tempo diminui significativamente.

Apesar da técnica de AIF apresentar simplicidade quanto aos dispositivos empregados, os quais são normalmente encontrados em laboratórios, esta técnica é melhor aplicada a reações rápidas.

Na determinação de boro usando o sistema de AIF, apenas dois trabalhos são encontrados na literatura<sup>(67,68)</sup>.

Toeï *et alii*<sup>(67)</sup> fizeram determinações de boro, usando o sistema de AIF com o reagente H-resorcinol (ácido 4-(2,4-dihidroxifenilazo)-5-hidroxinaftaleno-2,7-dissulfônico). A absorbância foi medida em 510 nm. O limite de detecção encontrado foi de  $0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$  numa faixa de concentração até  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Este método apresentou bons resultados para análises de águas superficiais ou do mar, entretanto a faixa útil de concentração é muito pequena para análise de boro em plantas.

Krug *et alii*<sup>(68)</sup> investigaram a reação entre o boro e a azometina-H, visando a determinação de boro em plantas. As medidas da concentração de boro foram feitas com um tempo de residência de 40 segundos, numa faixa de concentração entre 0,1 e 6,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  com uma velocidade de 60 determinações por hora. Entretanto este método apresenta sensibilidade menor quando comparado aos demais métodos em fluxo segmentado discutidos anteriormente.

## - Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado

Como foi mencionado anteriormente, a segmentação em sistemas de análise em fluxo contínuo reduz a dispersão longitudinal. Isto permite o uso de longos tempos de residência sem prejudicar a sensibilidade em determinações que empregam reações cineticamente lentas. Em sistemas de fluxo contínuo não segmentado (AIF), o aumento do tempo de residência provoca um aumento da dispersão da amostra, acarretando conseqüentemente, uma diminuição da sensibilidade do método. Porém, em contrapartida, a técnica de AIF requer dispositivos muito mais simples e de baixo custo, comparado aos equipamentos empregados no sistema segmentado comercial (AFCS).

Em 1985, Pasquini<sup>(11,48)</sup> propôs um novo sistema de análise em fluxo contínuo segmentado que utiliza as boas características do sistema de AIF, como a simplicidade, reprodutibilidade, versatilidade e alta velocidade de amostragem, associados a baixos valores de dispersão D. Isto torna esta técnica, denominada análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM), potencialmente útil em determinações que empregam reações cineticamente lentas.

No sistema de AFCM, a amostra, juntamente com os reagentes e/ou diluentes, é introduzida no fluxo de um fluído carregador, separado por duas bolhas de ar. O fluxo monossegmentado é então, transportado através de uma bobina de reação, com dispersão mínima, durante o tempo necessário para que a reação se complete. Previamente à detecção, os segmentos de ar são removidos e o fluxo resultante, agora contínuo, é imediatamente transportado para uma cela de fluxo, onde são feitas as leituras e o registro dos sinais. Os detalhes desta metodologia estão descritos na Parte Experimental desta tese (Capítulo III).

## CAPÍTULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

## III.1. SÍNTESE DO REAGENTE

Em uma primeira etapa sintetizou-se o reagente colorimétrico azometina-H, empregado na determinação do boro. Este reagente, de síntese relativamente fácil, é o produto da condensação do ácido 4-amino-5-hidroxi-2,7-naftalenodissulfônico (comercialmente conhecido como ácido-H) na sua forma monossódica e o aldeído salicílico.

O procedimento utilizado na síntese deste reagente, tomando-se como base os trabalhos de Basson *et alii*<sup>(52)</sup> e Lachica<sup>(69)</sup>, consiste na adição de 10,0 g do sal monossódico do ácido-H (Carlo Erba) à 500 ml de água deionizada, sob agitação, em um béquer de um litro. À suspensão obtida adicionou-se, lentamente, uma solução de hidróxido de sódio (Merck-PA) a 10% m/V, até pH 7,0, monitorado com um medidor de pH Micronal B 375. Ainda sob agitação, adicionou-se, vagarosamente, ácido clorídrico concentrado (Merck-PA) até pH 1,5 e, posteriormente, 10 ml de aldeído salicílico (Riedel de Hßenag Seelze-Hannover).

A solução resultante foi então colocada em banho-maria, com temperatura de aproximadamente 45°C, sob forte agitação, durante uma hora. Após este período, a solução foi deixada em repouso, à temperatura ambiente, por cerca de 16 horas. O precipitado amarelo obtido foi filtrado em um funil de placa porosa (nº 04) de

250 ml, e lavado, quatro ou cinco vezes, com álcool etílico (Merck-PA). O produto foi seco em estufa entre 100 e 105°C até peso constante, e deve ser estocado em frasco escuro, bem vedado e guardado em dessecador.

### III.2. SOLUÇÕES E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As soluções utilizadas neste estudo foram preparadas usando água deionizada e reagentes de grau analítico, em balões volumétricos de polipropileno (Nalgene). Frascos de polietileno de alta densidade foram empregados na estocagem das soluções.

A solução-estoque de boro ( $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi preparada por dissolução de 5,7178 g de ácido bórico (Carlo Erba - RPE) em água, seguida de diluição a um litro. As soluções-padrão de boro, de concentrações variáveis entre 0 e  $5,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ , foram preparadas diariamente a partir da solução-estoque, por diluição adequada com solução de ácido clorídrico (Merck-PA) 0,10 M. Estas diluições foram feitas empregando-se uma microbureta de pistão Metrohm modelo E-457 com ponteira de 0,5000 ml.

Nas melhores condições de rotina, a solução de azometina-H foi preparada adicionando-se 0,60 g de azometina-H e 2,0 g de ácido ascórbico-L (Merck-PA) em aproximadamente 50 ml de água, sob agitação, até a dissolução completa da mistura. Após isto, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e o volume completado até a marca. Todas as soluções deste reagente, inclusive as usadas nas experiências exploratórias, foram preparadas diariamente e da mesma maneira descrita

acima, mudando-se apenas a quantidade de azometina-H ou de ácido ascórbico.

Como a reação do boro com a azometina-H requer um meio tamponado e é susceptível a interferências de outros elementos<sup>(34)</sup>, usou-se neste trabalho uma solução tampão, contendo uma substância mascarante. Para as condições de rotina a solução tampão-mascarante foi preparada adicionando-se 14,0 g de hidrogenofosfato de amônio (Merck-PA) e 5 g de EDTA (sal dissódico - Carlo Erba - RPE) em 100 ml de água. O pH desta solução foi, posteriormente, ajustado em  $8,1 \pm 0,2$  com uma solução de hidróxido de amônio (Merck-PA) 2:1 em água. Nas experiências de varredura efetuadas (Capítulo IV), outras concentrações deste tampão/mascarante e outros tampões foram testados (ver Apêndice 2).

As soluções 0,10 M dos ácidos clorídrico (Merck-PA), nítrico (Merck-PA), sulfúrico (Merck-PA), perclórico (Merck-PA) e acético (Merck-PA) empregados como carregador no sistema de fluxo, foram preparadas a partir de seus respectivos ácidos concentrados.

As soluções dos interferentes,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$ , foram preparadas a partir dos respectivos sais de cloreto para os cátions, e dos sais de potássio para os ânions, e também estão descritas detalhadamente no Apêndice 1.

As amostras fornecidas pelo "Plant Sample Exchange Programme" (PSEP) de setembro/outubro de 1986, foram tratadas de acordo com o procedimento empregado na análise rotineira de boro no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Este tratamento consiste em pesar ( $0,2500 \pm 0,0001$ ) g do material vegetal, seco e finamente moído, em cadinhos de porcelana, que são colocados em uma mufla a  $500^\circ\text{C}$ , durante duas horas. Às cinzas resultantes adicionam-se 10,00 ml de ácido clorídrico 0,10 M. Este procedimento foi

feito tomando-se as amostras em triplicata.

As soluções resultantes deste tratamento foram analisadas pelo método de AFCM, proposto neste estudo, e pelo método convencional, utilizado em rotina no laboratório de análise de plantas do IAC<sup>(70)</sup>. Este método convencional consiste em se adicionar, a cada alíquota de amostra ou padrão, 2 ml de uma solução tampão-mascarante (pH = 5)<sup>(\*)</sup> e agitar a mistura, adicionando-se a seguir, 2 ml da solução reagente (0,45% m/V de azometina-H, contendo 1% m/V de ácido ascórbico). A mistura é agitada novamente por mais alguns minutos e posteriormente, deixa-se a solução resultante em repouso por 30 minutos. Após este período, as absorvâncias destas soluções foram medidas em quintuplicata a 420 nm, usando-se um espectrofotômetro Varian modelo 634 e cubetas de 10,00 mm de caminho óptico.

### III.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A configuração do sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM), empregado na determinação de boro com o reagente azometina-H, está representada na figura III.1. De acordo com este esquema, as soluções do reagente, do tampão-mascarante e da amostra (ou padrão) são simultaneamente transportadas pa-

---

(\*) Este procedimento convencional utiliza um tampão acetato, o qual foi preparado dissolvendo-se 500 g de acetato de amônio e 30 g de EDTA (sal dissódico) em 800 ml de água, adicionando-se, em seguida, 250 ml de ácido acético glacial.

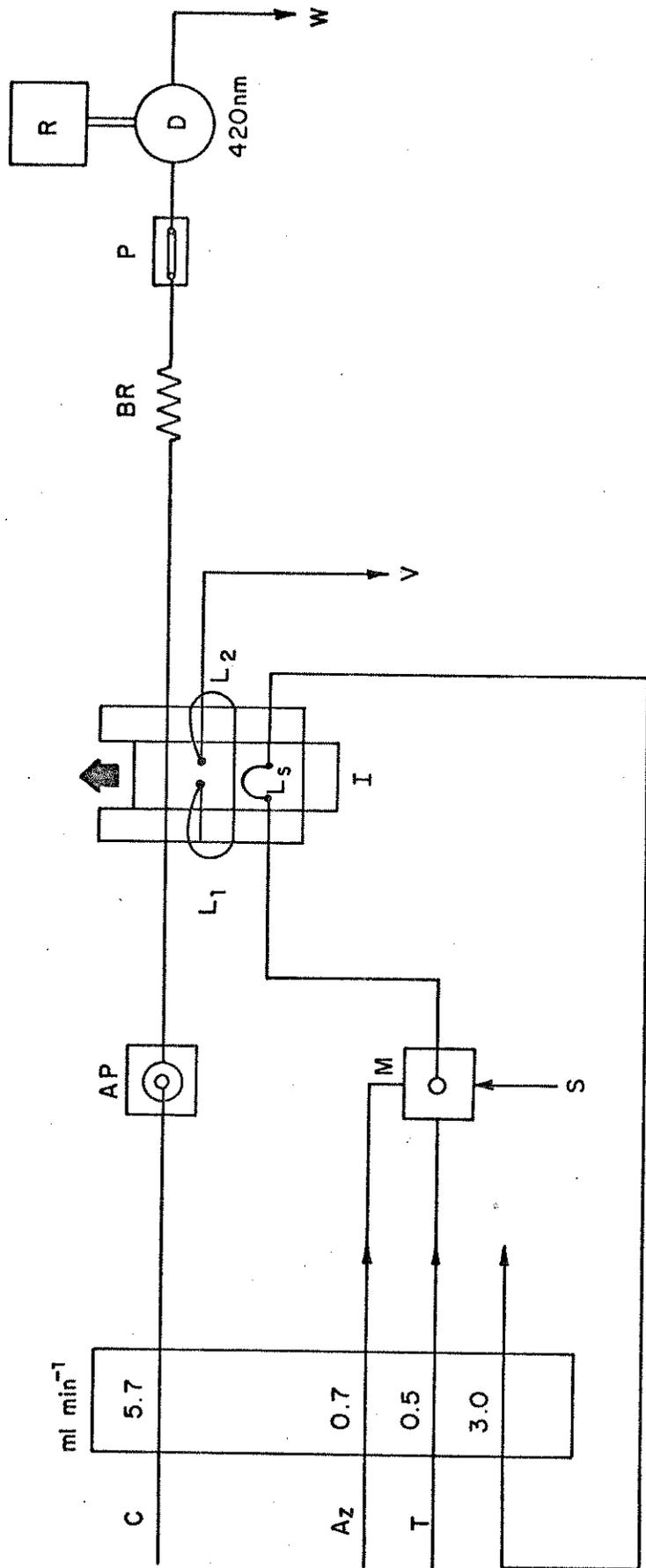


Figura III.1: Configuração do sistema de AFPM usado na determinação espectrofotométrica de boro com azometina-H. C, carregador (HCl 0,10M). Az, solução do reagente Azometina-H. T, solução tampão-mascarante. AP, amortecedor de pulso. M, microcâmara de mistura. S, amostra. L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, segmentos para introdução de bolhas de ar. I, amostrador. Ls, injetor. V, sucção. BR, bobina de reação. P, cela de permeação. D, detector espectrofotométrico, R, registrador. W, descarte. As vazões dos fluídos estão indicadas na figura.

ra uma microcâmara de mistura (M, indicada na figura III.1 e detalhada na figura III.2).

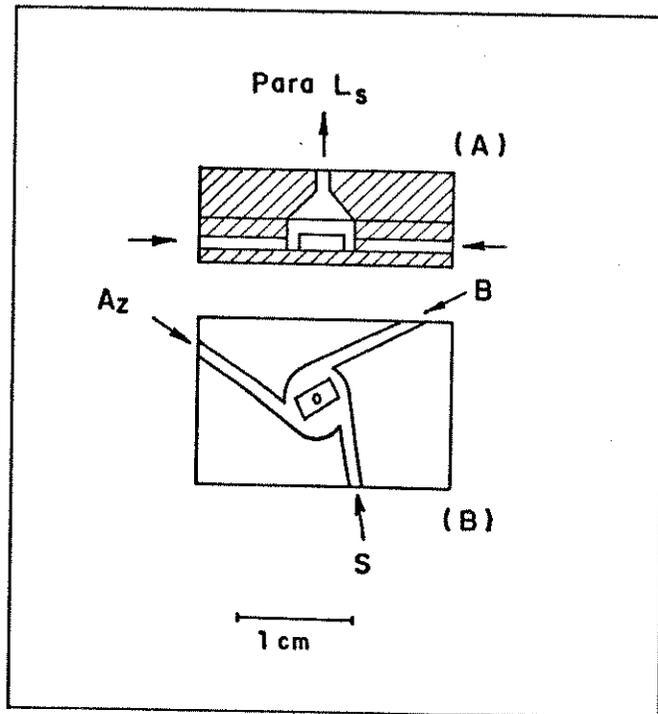


Figura III.2: Microcâmara de mistura. A: corte transversal e B: vista superior. Volume interno líquido: 175  $\mu$ l.

Este misturador foi construído em acrílico e é composto por duas partes, que são fixadas entre si com cola de silicone (Rhodia). A parte inferior possui três entradas para os fluídos confluentes e a parte superior uma saída da mistura para o injetor. No seu interior foi colocada uma barra magnética de agitação revestida com teflon, resultando em um volume interno líquido de 175  $\mu$ l.

Outros misturadores, como os conectores tipo "T" acoplados a bobinas de mistura de diferentes tamanhos, e as pequenas colunas empacotadas com pérolas de vidro<sup>(48)</sup> também foram testados. Porém, os melhores resultados quanto a homogeneidade da solução resultante, foram observados com a microcâmara, devido aos altos

valores de dispersão obtidos com este tipo de misturador<sup>(65, 71)</sup>.

A mistura reacional resultante é transportada até o amostrador  $L_s$ , definido por um segmento de tubo de polietileno com 1,5 mm de diâmetro interno (CPL - referência 200). Nas condições de rotina, descritas a seguir, usou-se um amostrador com um volume de 350  $\mu$ l.

Através de um injetor tipo proporcional<sup>(63)</sup> (I, indicado na figura III.1) comumente utilizado em análises por injeção em fluxo (AIF), com a configuração apropriada<sup>(11)</sup> para o sistema de AFCM, a mistura reacional é introduzida na linha do carregador (C, representado na figura III.1) entre duas bolhas de ar. Estas bolhas de ar, que segmentam a mistura, são obtidas através de segmentos de tubos de polietileno ( $L_1$  e  $L_2$ ) com 0,8 mm de diâmetro interno (CPL- referência 90) que resultam em um volume aproximado de 30  $\mu$ l.

A mistura reacional ladeada por duas bolhas de ar é então transportada até a bonina de reação (BR, indicada na figura III.1). A bobina de reação, que determina o tempo de residência para se obter uma sensibilidade adequada, é constituída de tubos de polietileno de 2,0 mm de diâmetro interno (CPL - referência 320) enrolados em um suporte de 15 cm de diâmetro. Para as demais linhas de transmissão foram utilizados tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno (CPL - referência 90).

Antes da detecção, as bolhas de ar são removidas por uma cela de permeação (P, indicada na figura III.1). Uma membrana de teflon comercial - 100% PTFE<sup>(\*)</sup> (Vedarosca, Incoflon) de aproximadamente 68  $\mu$ m de espessura é utilizada para a permeação da bolhas<sup>(11, 48)</sup>. Esta cela, descrita detalhadamente na figura

---

(\*) PTFE: politetrafluoroetileno.

III.3; foi confeccionada de acordo com a descrição de Pasquini<sup>(11)</sup>,

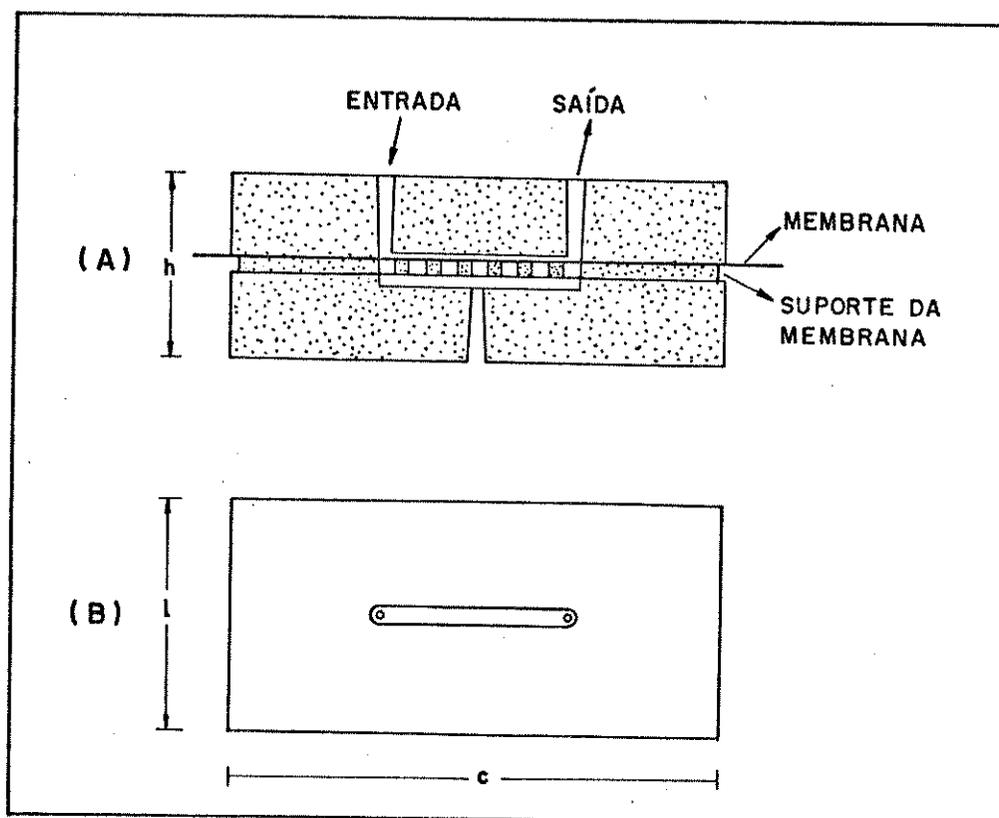


Figura III.3; Cela de permeação. A: corte transversal e B: vista superior. Volume de ranhura:  $8 \mu\text{l}$ . Dimensões de ranhura, comprimento: 2 cm e profundidade: 0,2 mm. Dimensões externas,  $h = 16 \text{ mm}$ ,  $c = 30 \text{ mm}$  e  $l = 15 \text{ mm}$ . O desenho não está em escala.

mas de forma mais compacta, o que facilita a interligação entre a saída da cela de permeação e da cela de fluxo, resultando em uma dispersão menor da mistura do carregador. Quando se usa vazões relativamente altas como neste trabalho ( $5,7 \text{ ml min}^{-1}$ ), não há necessidade da aplicação de sucção na cela de permeação, como acontece quando vazões menores são utilizadas<sup>(11)</sup>. Após um período de 8 horas é aconselhável a substituição da membrana de PTFE por outra, caso contrário bolhas de ar poderão ser transferidas para

cela de fluxo causando ruídos no sinal.

A cela de permeação pode ser substituída por um sistema de reamostragem<sup>(72)</sup>. O sistema de reamostragem baseia-se na remoção mecânica da zona de amostra, usando-se um ou dois injetores. A montagem deste sistema com dois injetores, mostrada na figura III.4, apresenta vantagens como a possibilidade de se reduzir a vazão da solução de limpeza e diminuir o comprimento da bobina de reação, facilitando assim, o ajuste do tempo de residência, sem prejudicar a velocidade analítica.

No transcorrer deste trabalho usou-se preferencialmente a cela de permeação, por esta apresentar facilidades de manuseio, sem a necessidade do uso de sistemas mais sofisticados para um controle preciso do tempo de amostragem, necessário quando a remoção mecânica das bolhas de ar é empregada. Isto, além de ser prático em termos de rotina, diminuirá também o custo do equipamento utilizado sem, no entanto, diminuir a sua eficiência.

Como o processo de bombeamento causa pulsação, que se apresenta de forma mais intensa na bobina de reação, devido a alta compressibilidade do ar em relação à água, é recomendável o uso de um amortecedor de pulso (AP, indicado na figura III.1) na linha do carregador. Este amortecedor tem como função minimizar a amplitude de pulsação, além de facilitar a remoção das bolhas de ar, tanto pela cela de permeação como no processo de reamostragem. A figura III.5 mostra a descrição detalhada deste amortecedor, que foi construído em acrílico, cujas dimensões são indicadas para vazão de, no máximo,  $7,0 \text{ ml min}^{-1}$ .

As medidas espectrofotométricas foram feitas em  $420 \text{ nm}$  (34, 40, 68), usando um espectrofotômetro Zeiss modelo PM2A, em conjunto com uma cela de fluxo de vidro de  $10,0 \text{ mm}$  de caminho óp-

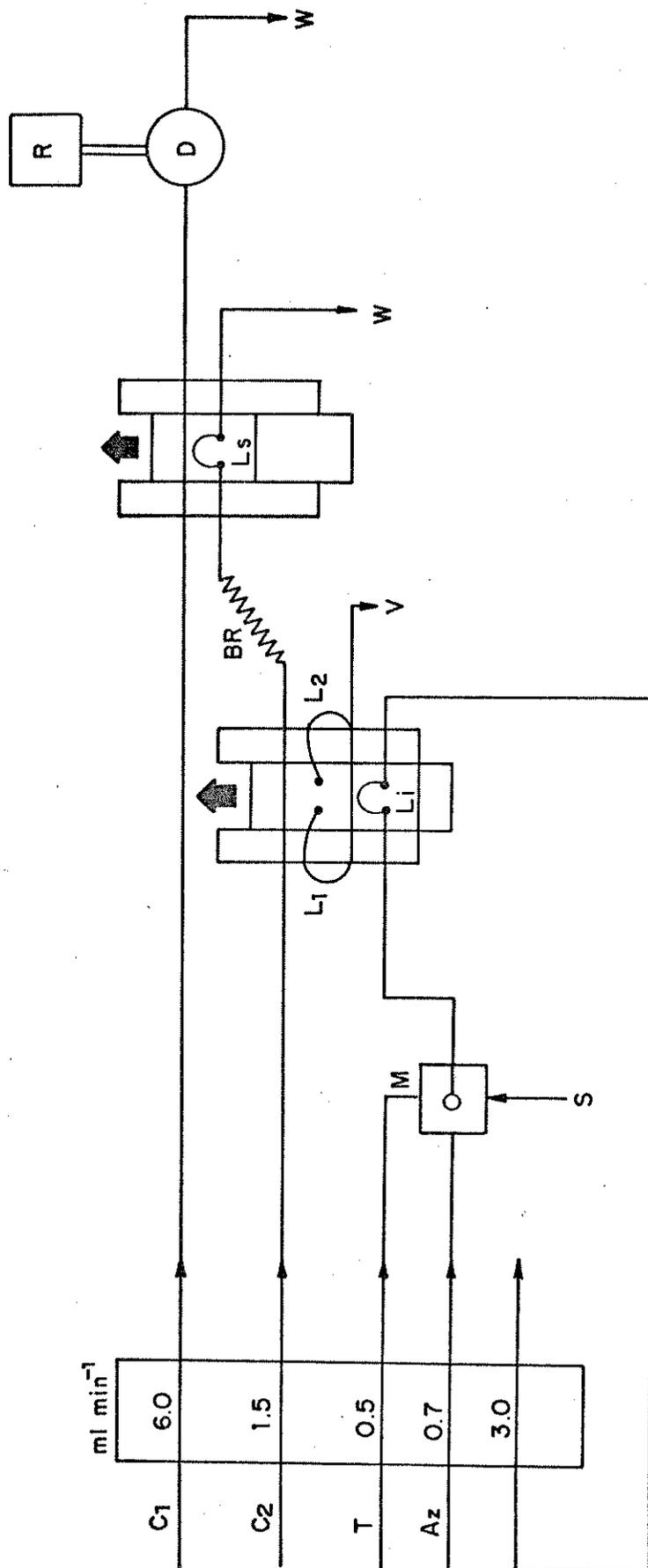


Figura III.4: Configuração do sistema de AFCM para a determinação espectrofotométrica de boro usado no processo de reamostragem com dois injetores. C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, carregadores. Li, amostrador da zona da mistura (Volume = 500  $\mu\text{l}$ ). Para outros detalhes ver a figura III.1.

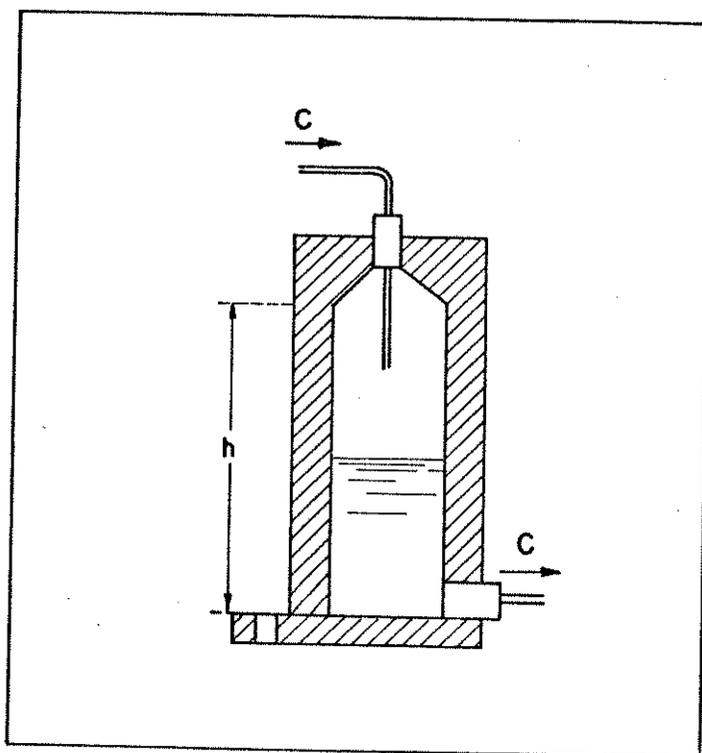


Figura III.5: Amortecedor de pulso. Dimensões, altura,  $h$ : 25 mm e diâmetro interno: 7 mm.

tico, com capacidade de  $80\mu\text{l}$ . Os registros espectrofotométricos, expressos em transmitância, foram feitos em um registrador Varian modelo Linear 1200.

As soluções foram impulsionadas por uma bomba peristáltica Micronal modelo B 337 com 6 canais, através de tubos de bombeamento Tygon (Technicon) de diferentes diâmetros.

As vazões das soluções indicadas na figura III.1 foram as melhores encontradas para as condições experimentais da AFCM descritas neste trabalho.

Para a operação de comutação do injetor proporcional, foi utilizado um sistema de dois solenóides (Seumar S.A, modelo 812 TC, 220 V e 60 Hz), controlados por um temporizador (*tímer*) eletrônico digital. Dentre os vários tempos de carga e descarga testados durante este trabalho, os melhores resultados foram ob-

tidos com 20 segundos para a amostragem e 10 segundos para a descarga do amostrador na bobina de reação. Estes tempos determinam portanto, uma velocidade analítica de 120 determinações por hora.

Devido à diferença de compressibilidade entre líquidos e gases, é necessário que o procedimento de análise tenha início somente após o preenchimento total da bobina de reação com o fluído monossegmentado. Isto é realizado com a injeção sequencial de brancos até se obter o equilíbrio do sistema. Após o estabelecimento deste equilíbrio observa-se que os sinais espectrofotométricos do branco são constantes e reproduzíveis.

A troca das amostras deve ser efetuada apenas quando o injetor é comutado para a posição de descarga. Este procedimento dá ao operador um tempo suficiente para a troca em si (quando necessária), para a lavagem do amostrador (Ls) com a nova solução, além de eliminar as bolhas indesejáveis que são introduzidas na linha do amostrador quando se efetua a troca da amostra.

Um contador numérico digital pode ser acoplado ao injetor, com a finalidade de fornecer ao operador, em qualquer tempo, o número de injeções realizadas. Em trabalhos de rotina, onde um grande número de amostras são analisadas, muita confusão poderá ocorrer com relação à contagem do número de injeções e de amostras, se um contador não for utilizado para este fim. Um contador digital, simples e de baixo custo, pode ser construído usando-se o mostrador e o circuito lógico de uma calculadora de bolso<sup>(73)</sup>.

### III.4. ESTUDO DOS INTERFERENTES

As experiências de verificação do comportamento dos possíveis interferentes em análise de plantas foram feitas usando-se um arranjo do sistema de fluxo monossegmentado, conforme a descrição da figura III.6. Neste esquema as soluções padrão e interferente confluem entre si através de um conector acrílico<sup>(74)</sup>. Esta mudança foi feita para facilitar o preparo das soluções interferentes e padrão. As linhas do interferente e do padrão foram bombeadas com a mesma vazão. Cuidou-se para que a vazão total resultante (soma de ambas as vazões individuais) correspondesse exatamente ao valor da vazão de sucção da amostra mencionada na figura III.1. Com isto evitou-se alteração nas condições experimentais originais.

Para a determinação precisa da diluição entre as soluções interferente e padrão, utilizou-se o conceito de fator de diluição<sup>(74, 75)</sup>, calculado através da razão de fluxo,  $R_f$ , usando a seguinte fórmula:

$$R_f = A_T/A_I$$

onde  $A_T$  é a absorvância total e  $A_I$  é a absorvância da linha do interferente<sup>(74, 75)</sup>.

Para as medidas de absorvância  $A_T$  e  $A_I$ , foi utilizada uma solução do corante alaranjado de metila, que também absorve em 420 nm. A absorvância total,  $A_T$ , foi obtida com a solução do corante fluindo pelas duas linhas e  $A_I$  pela medida da absorvância do corante na linha do interferente e água na linha do boro. As medidas foram realizadas diariamente, antes do início de cada es-

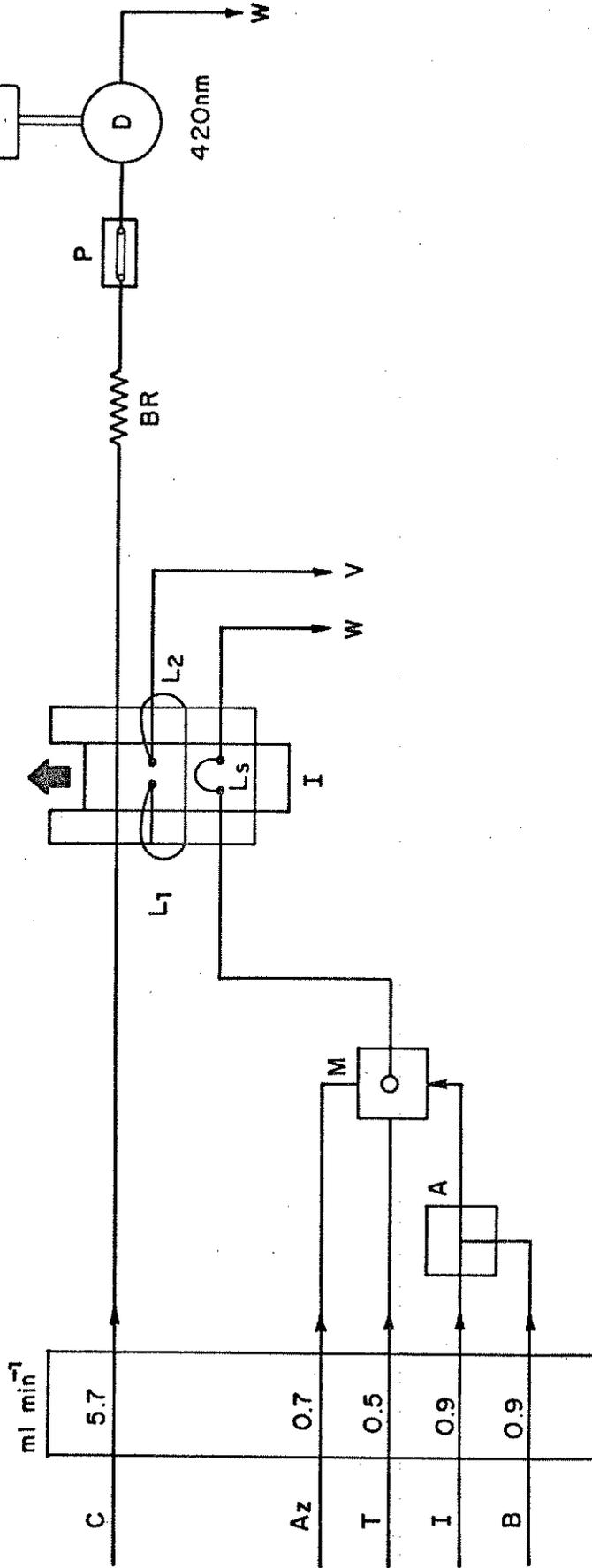


Figura III.6; Configuração do sistema de AFM para a determinação espectrofotométrica de boro usando para o estudo dos interferentes. I, solução do interferente. B, solução de boro. Para outros detalhes ver a figura III.1.

tudo de interferência e podem ser facilmente repetidas a qualquer tempo, para fins de verificação do funcionamento do sistema.

Os resultados encontrados com o estudo dos interferentes estão tabelados e discutidos no Capítulo IV.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de fluxo monossegmentado para a determinação espectrofotométrica de boro em azometina-H foi montado segundo o esquema apresentado na figura III.1 (p.41 ). As condições ótimas de análise foram obtidas através de experiências de varredura envolvendo as diversas variáveis deste sistema. A avaliação dos resultados foi feita considerando-se a média de pelo menos três injeções de uma mesma solução de boro, após a correção dos valores contra o branco.

A variação na intensidade da cor da solução de azometina-H em presença do ácido bórico é influenciada pelo pH<sup>(34)</sup>. Nos procedimentos estáticos convencionais<sup>(34,40,43)</sup> e nos procedimentos usando o sistema segmentado<sup>(52,54)</sup>, a faixa de pH usual para o melhor desenvolvimento da cor, se encontra entre 4,5 e 6,5, e são obtidos com o emprego de um tampão ácido acético-acetato. Entretanto, nos estudos efetuados por Krug *et alii*<sup>(68)</sup>, usando o sistema de AIF, os melhores resultados foram obtidos usando-se um tampão hidrogenofosfato de amônio, o qual resultava em valores de pH entre 7,0 e 7,5, medidos antes do descarte. De acordo com estes pesquisadores, este comportamento é observado devido a ciné-

tica da reação. Em um pH de aproximadamente 5,0, o desenvolvimento da cor é lento, alcançando um máximo de absorbância em cerca de duas horas, enquanto que em pH 7,3 a reação se completa em poucos minutos, mantendo uma absorbância constante entre, aproximadamente, 5 e 90 minutos, determinados através de estudos de parada de fluxo ("stopped-flow").

Um estudo usando o tampão acetato foi efetuado nas condições do sistema monossegmentado, com variações na concentração do acetato de amônio (e conseqüentemente no pH), mas os resultados observados não foram satisfatórios. A reprodutibilidade não foi boa, além de se obter baixa sensibilidade, mesmo com o uso de altas concentrações do tampão. Descartou-se portanto o uso deste tipo de tampão no sistema AFCM.

Testaram também soluções tampão segundo Sørensen<sup>(76)</sup>, que foram preparadas a partir das soluções de hidrogenofosfato de sódio e dihidrogenofosfato de potássio, com pH variável de 7,0 a 8,0. O uso deste tipo de tampão resultou em uma sensibilidade ainda mais baixa que a obtida com o uso do sistema ácido acético-acetato. As razões deste comportamento não foram investigadas, por não se tratar do objetivo principal desta tese, e por terem sido observados resultados satisfatórios com o tampão hidrogenofosfato de amônio, sugerido por Krug *et alii*<sup>(68)</sup>.

A partir destas observações, realizou-se, então, um estudo sobre a influência da concentração analítica do hidrogenofosfato de amônio no sinal espectrofotométrico, empregando a técnica de AFCM. Os resultados se encontram descritos na figura IV.1. O valor máximo do sinal é observado na faixa de concentração entre 14,0 e 15,0% m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Para a seqüência deste trabalho optou-se pela concentração analítica de 14,0% m/V. Este valor é muito menor que o empregado no sistema AIF<sup>(68)</sup> (26,4% m/V). Neste

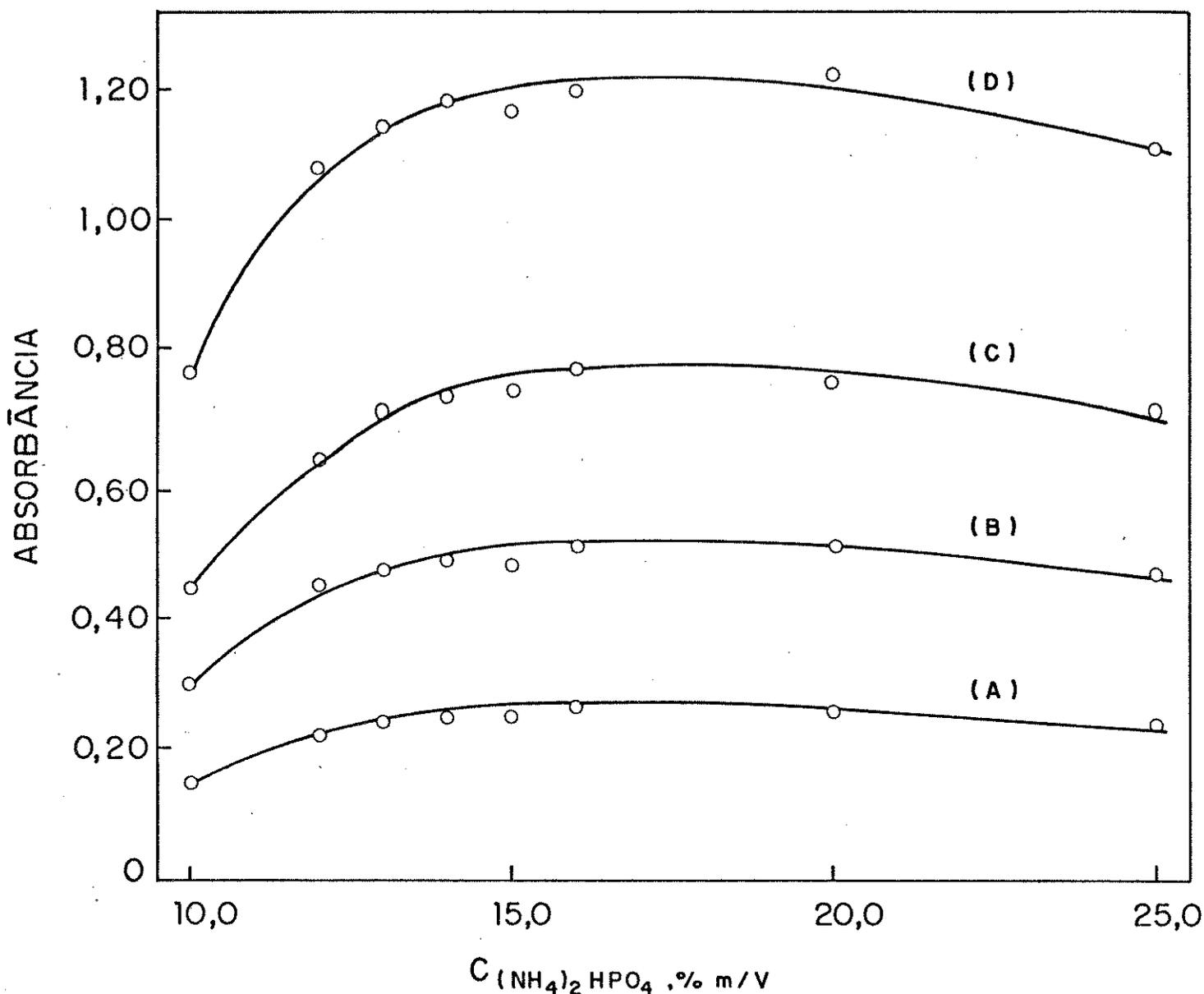


Figura IV.1: Efeito da concentração analítica do hidrogeno fosfato de amônio sobre o sinal espectrofotométrico. Concentração de boro: A,  $1,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; B,  $2,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; C,  $3,00 \mu\text{g ml}^{-1}$  e D,  $5,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Solução do reagente: 0,60% m/V de azometina-H em 2,0% m/V de ácido ascórbico. Tempo de residência: 280 s.  $L_s = 300 \mu\text{l}$ . Todos os resultados foram corrigidos contra o branco. As soluções testadas não continham EDTA.

estudo observou-se também que, a simples variação da concentração do hidrogenofosfato de amônio na solução tampão, provoca uma mudança do pH na faixa de 7,9 a 8,1 para uma faixa de concentração situada entre 10,0 e 25,0% m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , conforme a descrição no Apêndice 1.

Com a concentração da solução tampão fixada em 14,0% m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , fez-se então uma avaliação da influência do pH nos sinais obtidos pelo método de AFCM. A variação do pH na solução tampão foi obtida por adição de ácido clorídrico ou amônia.

Pode-se verificar através da figura IV.2, que o sinal espectrofotométrico é apenas levemente alterado na faixa de pH testado (entre 7,7 e 8,5), indicando que pequenas variações no pH da solução tampão não são críticas para a determinação de boro com azometina-H, usando a técnica de AFCM. Escolheu-se então, para se dar prosseguimento ao estudo dos demais parâmetros, uma solução tampão de concentração 14,0% m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em pH  $8,1 \pm 0,2$ . Sob estas condições, o pH medido no final da linha de descarte é  $6,5 \pm 0,2$ .

Baseados em estudos anteriores<sup>(52)</sup>, adotou-se o EDTA como agente mascarante. Entretanto a adição do EDTA ao tampão, provoca uma queda no seu pH, sendo necessário ajustá-lo em  $8,1 \pm 0,2$  com uma solução de amônia 2:1. Uma vez fixadas estas variáveis, verificou-se a influência da concentração analítica de EDTA no sinal registrado, cujos resultados estão apresentados na figura IV.3. Pode-se notar que praticamente não há variações na sensibilidade do método com a adição do EDTA no tampão, no pH escolhido.

O tempo de residência necessário para o desenvolvimento da cor entre o ácido bórico e a azometina-H foi também avaliado sob as condições dinâmicas experimentais do sistema monossegmentado. Segundo a figura IV.4, o tempo de residência mínimo necessá-

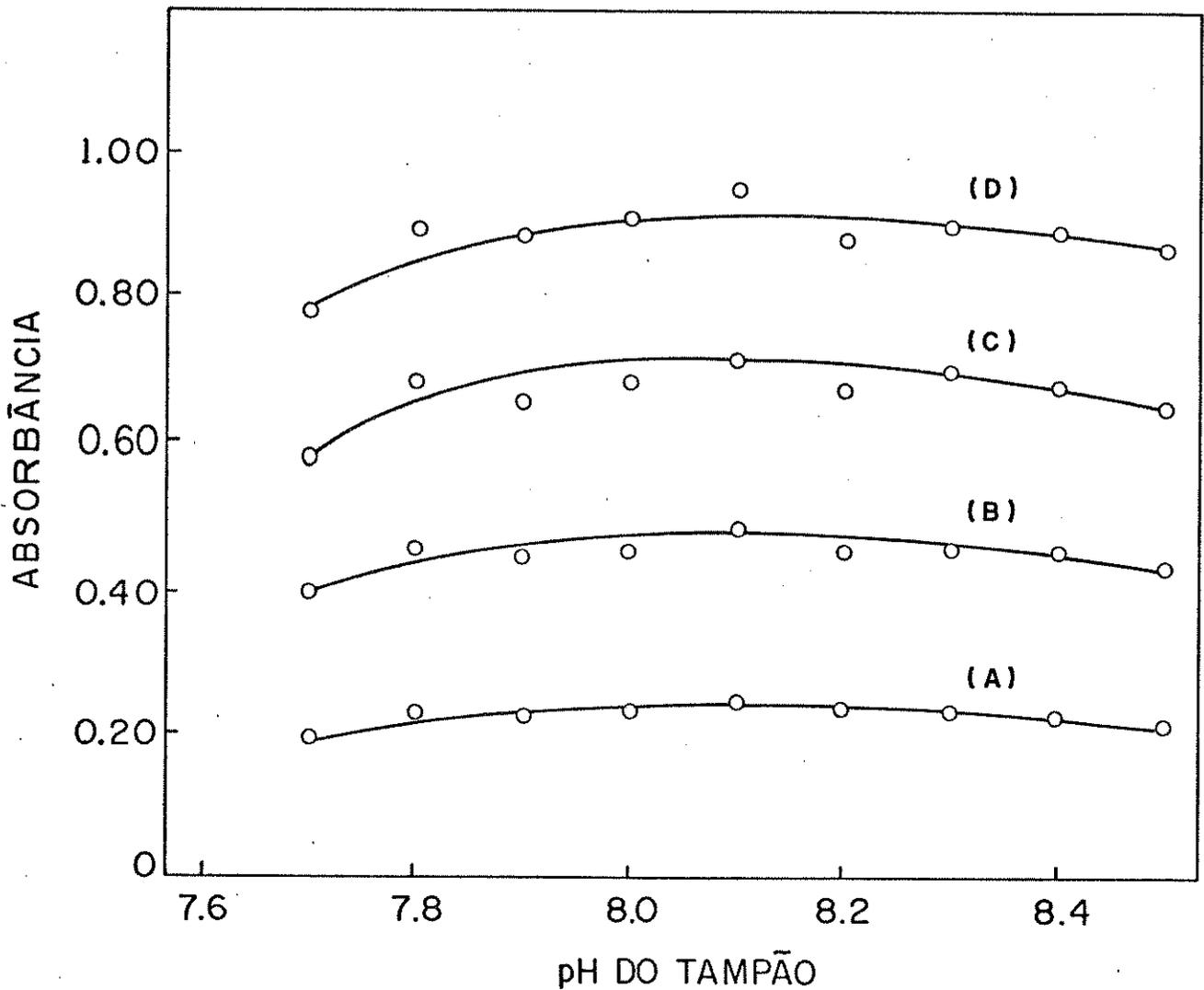


Figura IV.2: Estudo da influência do pH da solução tampão nos sinais espectrofotométricos do método de AFCM. Concentrações de boro: A, 1,00 µg ml<sup>-1</sup>; B, 2,00 µg ml<sup>-1</sup>; C, 3,00 µg ml<sup>-1</sup> e D, 4,00 µg ml<sup>-1</sup>. Solução tampão: 14,0% m/V de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Outras condições como descritas na figura IV.1.

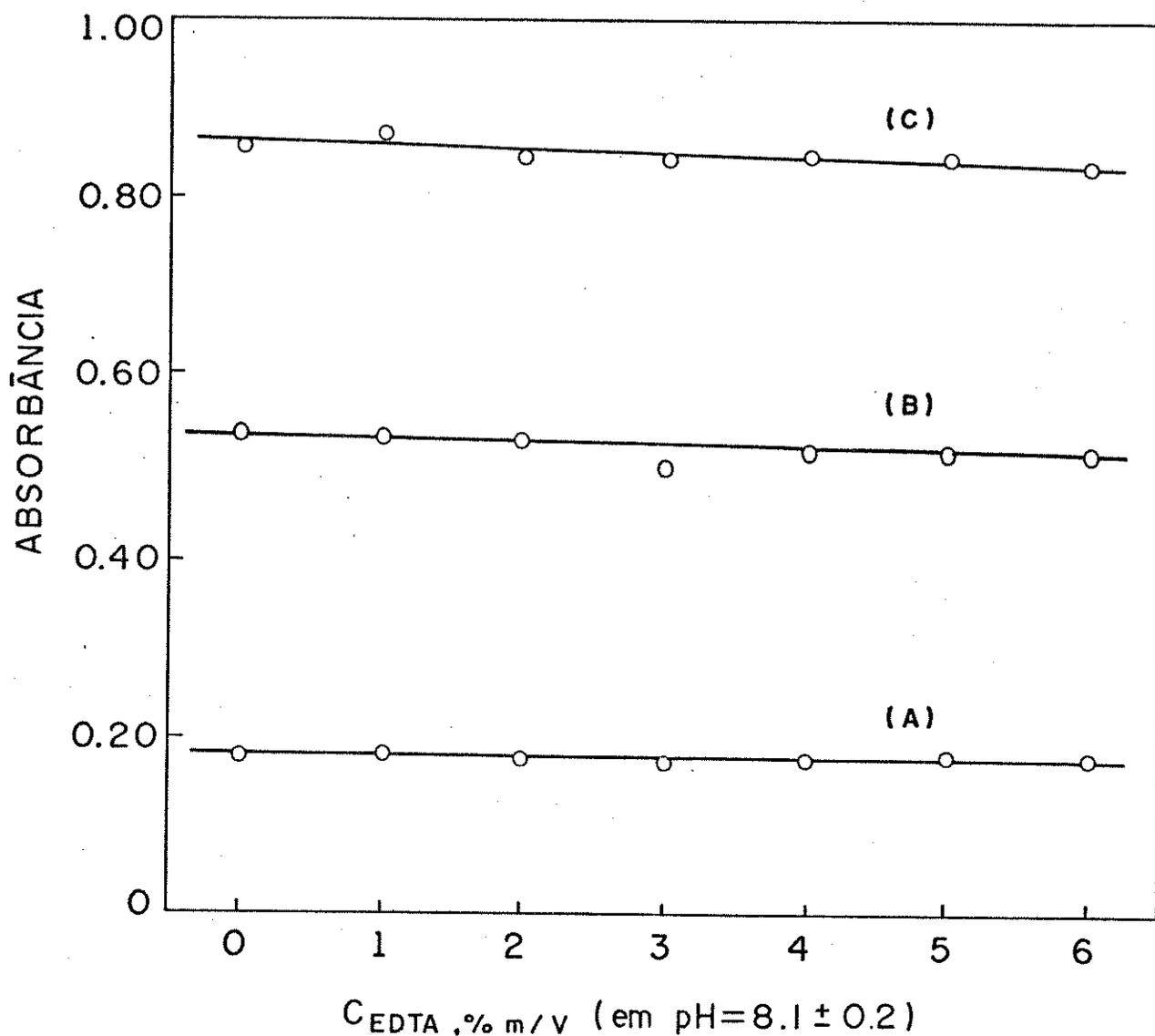


Figura IV.3: Variação da absorvância com a concentração analítica do EDTA na solução tampão de  $(NH_4)_2HPO_4$  a 14,0% m/V, em  $pH = 8,1 \pm 0,2$ . Concentrações de boro: A,  $1,00 \mu g ml^{-1}$ ; B,  $3,00 \mu g ml^{-1}$  e C,  $5,00 \mu g ml^{-1}$ . Demais condições experimentais como descritas na figura IV.1.

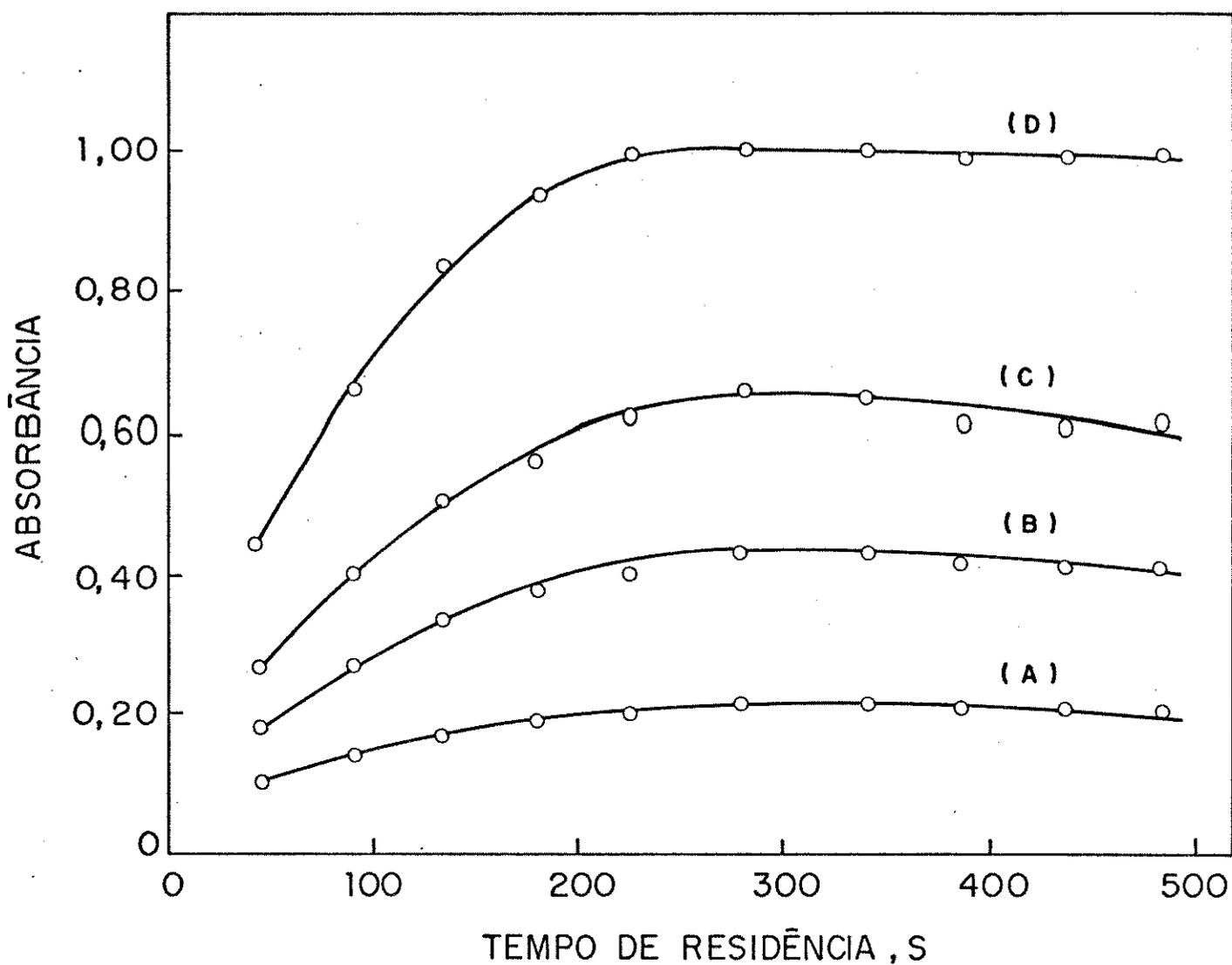


Figura IV.4: Variação do sinal espectrofotométrico com o tempo de residência da mistura reacional na bobina de reação. Solução tampão: 14,0 m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em 5% m/V de EDTA, com pH ajustado em  $8,1 \pm 0,2$ . Outras condições como descritas na figura IV.1.

rio para a reação se desenvolver plenamente, se encontra em aproximadamente 280 segundos. Este valor foi, também, confirmado usando-se um sistema de AIF com configuração de parada de fluxo ("stop-ped-flow")<sup>(66)</sup>, montado de acordo com o esquema descrito na figura IV.5, cujo registro está apresentado na figura IV.6. Nesta figura pode-se observar que o tempo de residência mínimo se encontra ao redor de 300 segundos, sendo este compatível com os valores anteriormente citados por Krug *et alii*<sup>(68)</sup>, segundo os quais o máximo de absorbância é obtido em aproximadamente 5 minutos e se mantém estável por pelo menos 90 minutos. Desta forma, estabeleceu-se um tempo de residência mínimo de 280 segundos para o estudo dos demais parâmetros da análise em fluxo monossegmentado.

Em seguida observou-se a variação da absorbância com a concentração analítica do reagente azometina-H representada na figura IV.7. O aumento na concentração do reagente azometina-H promove um acréscimo sistemático no valor da absorbância, até concentrações ao redor de 0,80% m/V de azometina-H. Para baixos níveis de boro, nota-se uma estabilização do sinal em concentrações acima de 0,80% m/V de azometina-H, enquanto que para quantidades maiores que  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  de boro (curvas C e D da figura IV.7) os dados não são completos porque os valores de absorbância se encontram fora da escala de medida direta. Como o intuito deste estudo visa a determinação de boro em plantas, segundo o procedimento de rotina do Instituto Agronômico de Campinas, o que geralmente se traduz em uma faixa de concentração entre 0 e  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  de boro, preferiu-se adotar uma concentração de azometina-H de 0,60% m/V para os estudos posteriores. Esta concentração, sob as condições dinâmicas experimentais do sistema de AFCM, implica em um consumo de 2,10 mg deste reagente por determinação, quantidade esta bem

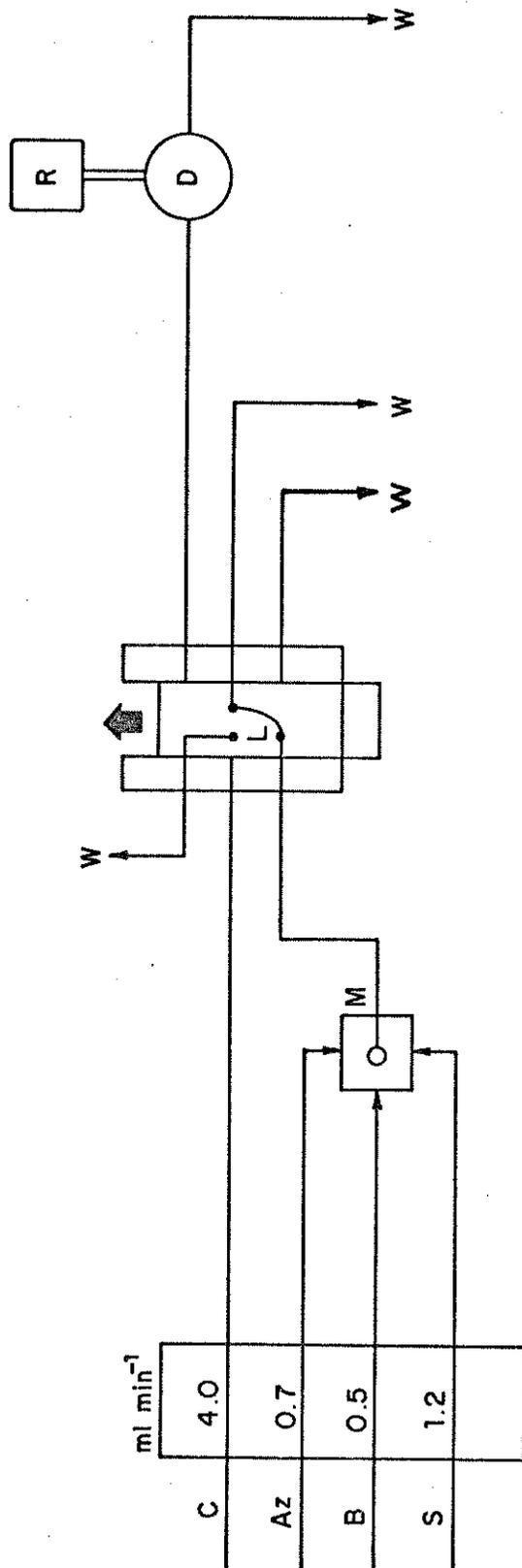


Figura IV.5: Configuração AIF de parada de fluxo ("stopped-flow"), empregada para a determinação do tempo ótimo de reação. Az, solução do reagente: azometina-H 0,60% m/V em 2,0% m/V de ácido ascórbico. T, solução tampão: 14,0% m/V  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em 5% m/V EDTA. Ls = 350  $\mu\text{l}$ .

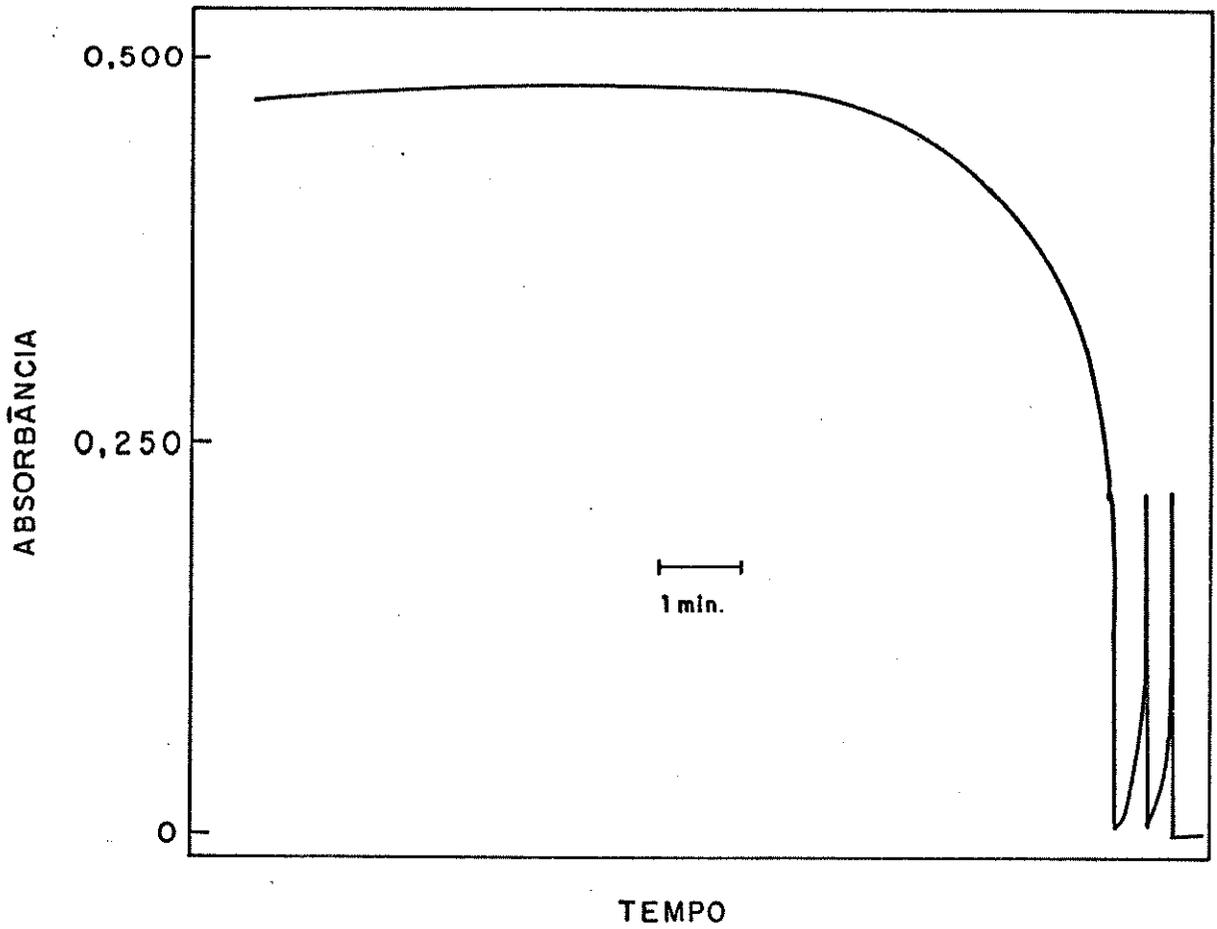


Figura IV.6: Registro do sinal obtido com a configuração apresentada na figura IV.5.

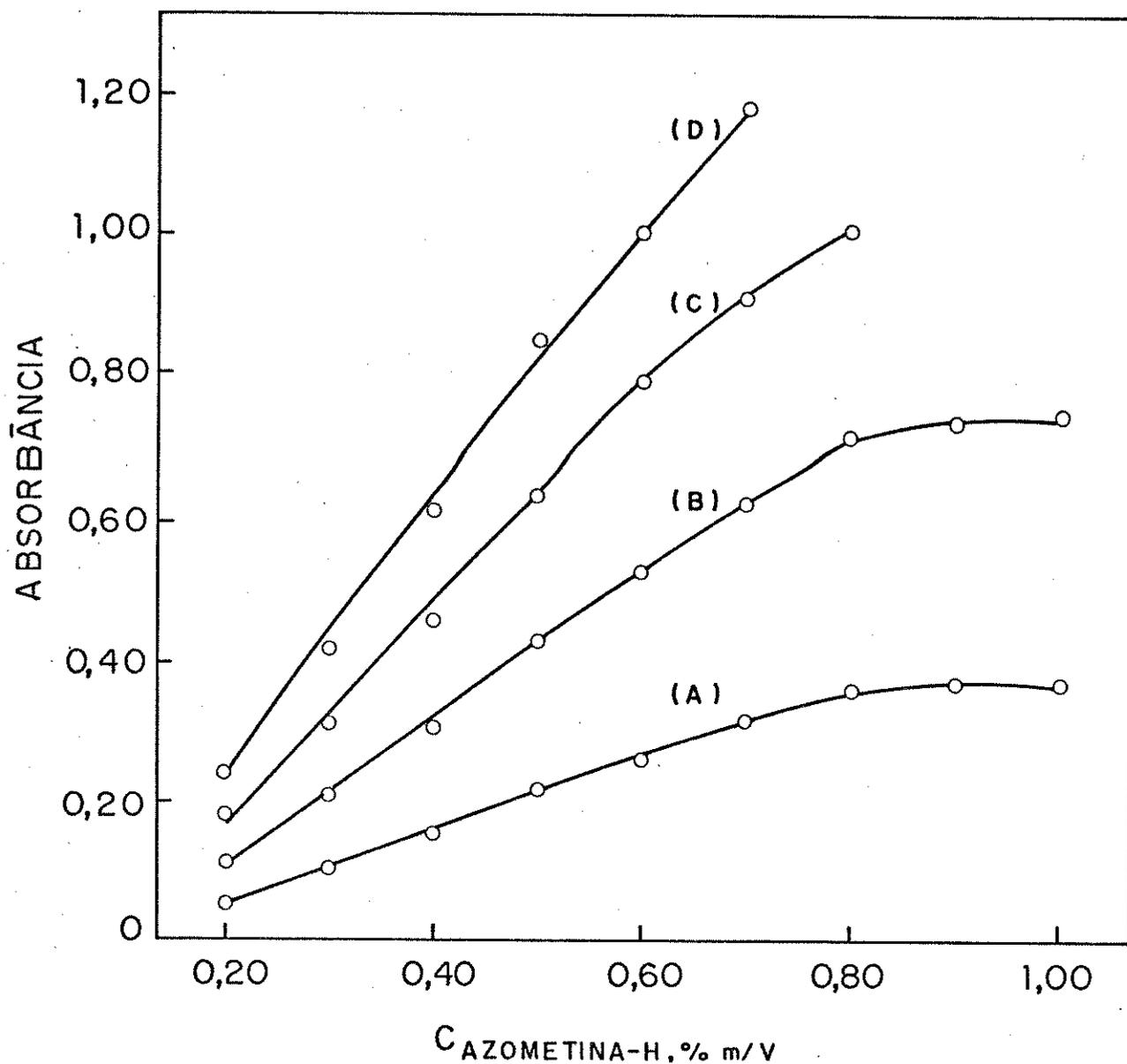


Figura IV.7: Estudo da variação do sinal espectrofotométrico com a concentração analítica da azometina-H em solução : 2,0% m/V de ácido ascórbico. Solução tampão: 14,0 m/V  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em 5% m/V EDTA, em  $\text{pH} = 8,1 \pm 0,2$ . Tempo de residência: 280 s.  $V_s = 300 \mu\text{l}$ . Concentração de boro: A,  $1,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; B,  $2,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; C,  $3,00 \mu\text{g ml}^{-1}$  e D,  $4,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Todos os resultados foram corrigidos contra o branco.

razoável, quando comparada aos outros métodos (ver Capítulo V).

Em todos os trabalhos subsequentes ao de Capelle<sup>(34)</sup>, a solução do reagente azometina-H é preparada em ácido ascórbico, usado como agente inibidor da oxidação. Entretanto, verificou-se que, ao contrário do que muitos supunham<sup>(52,68)</sup>, a adição do ácido ascórbico à solução de azometina-H diminui o sinal espectrofotométrico, pelo menos sob as condições de AFCM. Este fator pode ser facilmente verificado na Figura IV.8. Além disto, observou-se também que as soluções de azometina-H preparadas sem a presença de ácido ascórbico, não sofriam decomposição em, no mínimo, até 8 horas, conforme a descrição da figura IV.9. Apesar destas observações, optou-se pela adição de 2,0% m/V de ácido ascórbico à solução de azometina-H, para tornar possível uma comparação mais realista entre o método aqui descrito e os demais.

A variação do volume da mistura reacional injetado na linha do carregador não influencia significativamente as medidas de absorbância, principalmente entre os valores de 350 e 500  $\mu$ l, como pode se verificar através dos resultados apresentados na figura IV.10. Este comportamento é contrastante com o observado para o sistema de AIF, que sofre apreciável influência na sensibilidade com a variação do volume injetado. Isto ocorre porque no sistema de fluxo monossegmentado injeta-se a mistura reacional, que é então transportada ao detector praticamente sem dispersão, o que não ocorre com a técnica de AIF.

Na continuidade deste trabalho, escolheu-se um volume de injeção de 350  $\mu$ l, cerca de três vezes menor que o volume empregado no sistema similar de AIF.

O fluido carregador inicialmente utilizado na determinação de boro por AFCM foi a água, mas posteriormente, o uso de uma solução de HCL 0,1M demonstrou ser mais eficaz na limpeza da bobina

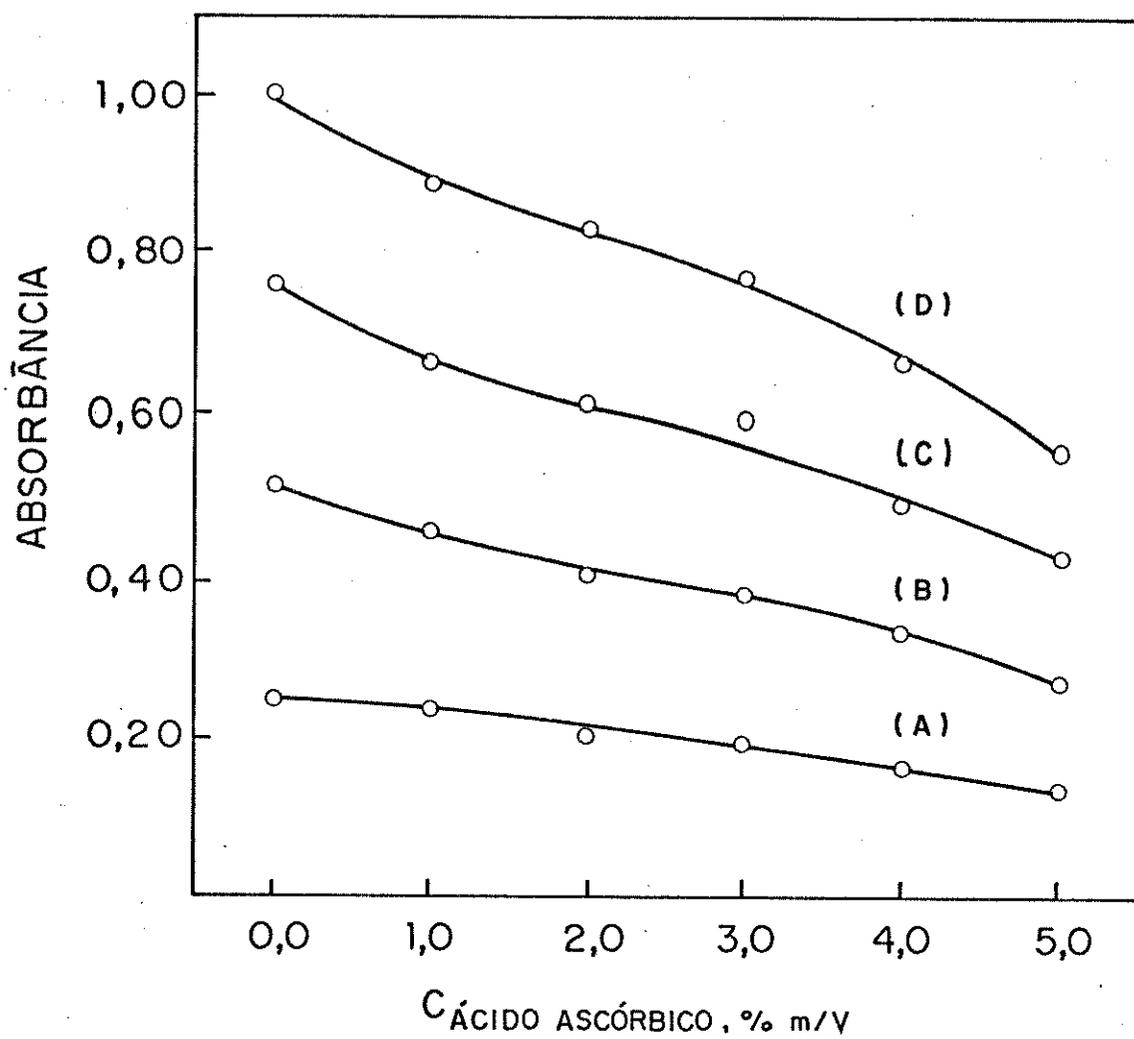


Figura IV.8: Influência da concentração analítica de ácido ascórbico adicionado à solução 0,60% m/V de azometina-H no sinal espectrofotométrico do método de AFCM. Outras condições experimentais estão descritas na figura IV.7.

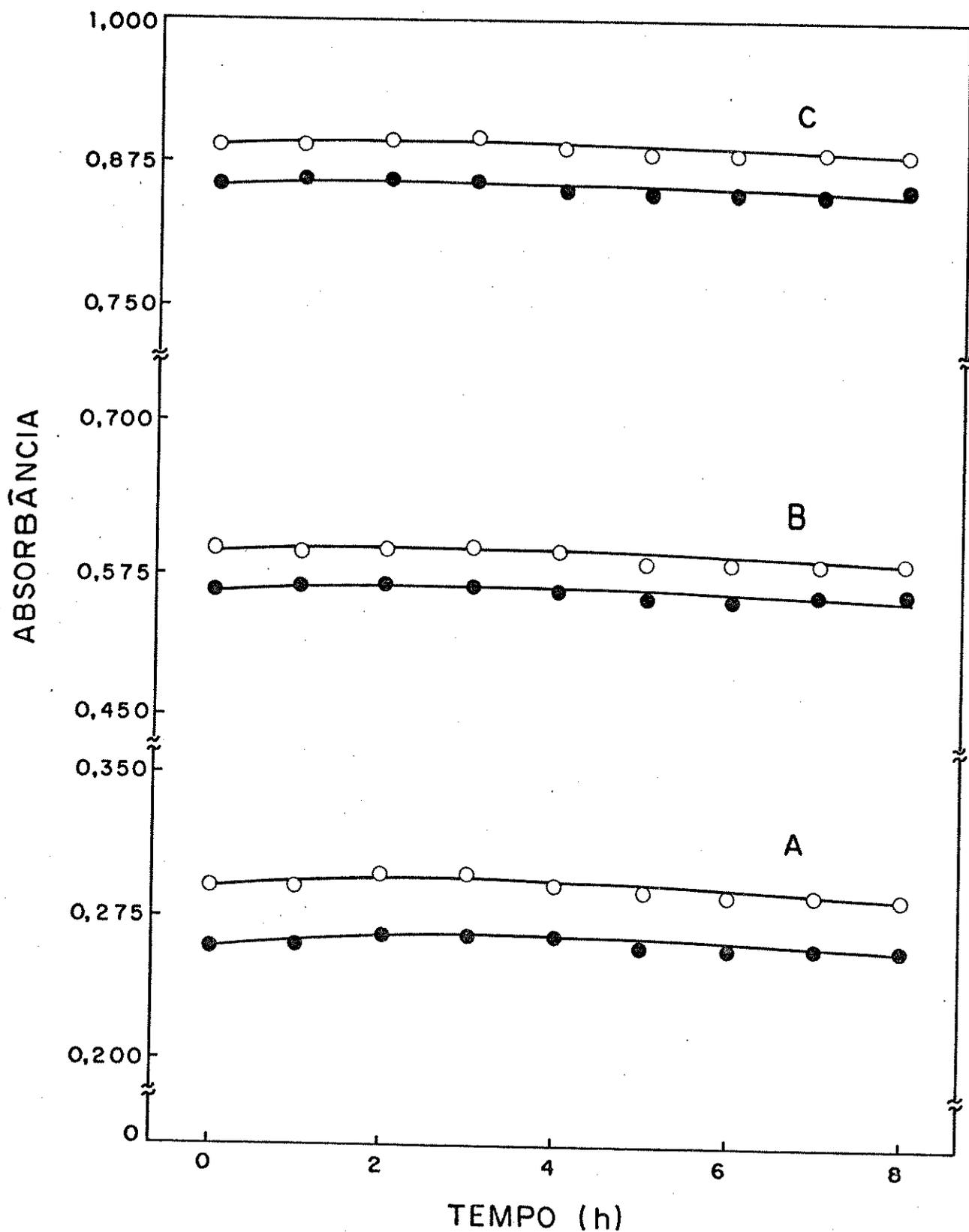


Figura IV.9: Verificação do comportamento da solução de azometina-H (0,60% m/V) com o tempo, O ponto inicial ( $t=0$ ) corresponde às soluções recém-preparadas. Concentrações de boro: A,  $1,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; B,  $2,00 \mu\text{g ml}^{-1}$  e C,  $3,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . As demais condições como descritas na figura IV.7.

(○) - sem ácido ascórbico

(●) - com 2,0% m/V de ácido ascórbico

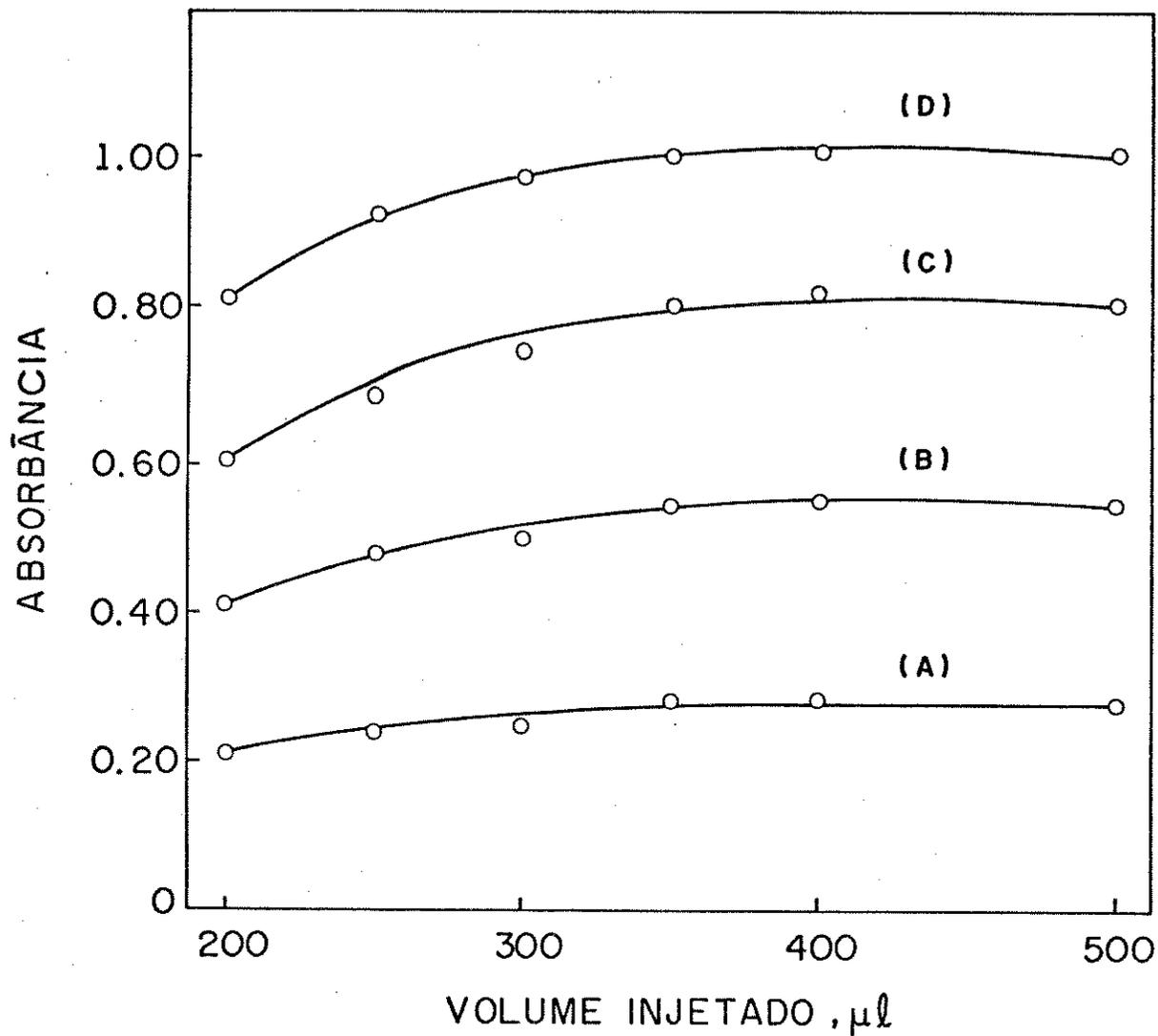


Figura IV. 10: Variação da absorvância com o volume injetado. Solução de azometina-H: 0,60% m/V em 2,0% m/V de ácido ascórbico. Outras condições como descritas na figura IV.7.

na de reação, além de fornecer um sinal menor para o branco em uma sensibilidade maior. Outras soluções de ácidos como o sulfúrico, o nítrico, o perclórico e o acético foram também testados como fluído carregador, mas em todos os casos os resultados apresentaram sensibilidade mais baixa, quando comparados com os obtidos com ácido clorídrico.

Quando se usa a cela de permeação, a vazão do fluído carregador deve ser a maior possível, para proporcionar uma limpeza mais eficiente entre as amostras. Várias vazões para o fluído carregador foram testadas, entre 3,9 e 6,2 ml min<sup>-1</sup>, tomando-se o cuidado para que o tempo de residência se mantivesse constante. Dentre os valores estudados, o melhor resultado foi o obtido com a vazão 5,7 ml min<sup>-1</sup>. Vazões mais altas provocam fragmentações na alíquota da mistura reacional. Como consequência desta fragmentação tem-se a intercontaminação e a diminuição da sensibilidade, causada pela dispersão das alíquotas no interior da bobina de reação.

As vazões da amostra, da solução de azometina-H e do tampão foram variadas em conjunto, conforme a tabela IV.1. O conjunto que apresenta a melhor sensibilidade é o que contém vazões de 3,0 a 0,7 e 0,5 ml min<sup>-1</sup> para as linhas de sucção, de bombeamento do reagente e do tampão, respectivamente. Estes foram os valores empregados no decorrer deste trabalho.

O registro típico dos sinais de um sistema de AFCM, como o descrito na figura III.1 (p. 41) para a determinação de boro, está representado na figura IV.11. Estes resultados, obtidos para uma curva de calibração, são lineares até 4,00 µg ml<sup>-1</sup> (figura IV.12 -  $A = 1,19 \cdot 10^{-2} + 2,50 \cdot 10^{-1} C_B$ , onde A, absorbância; C<sub>B</sub>, concentração analítica de boro em µg ml<sup>-1</sup>, r, coeficiente de correlação = 0,9998).

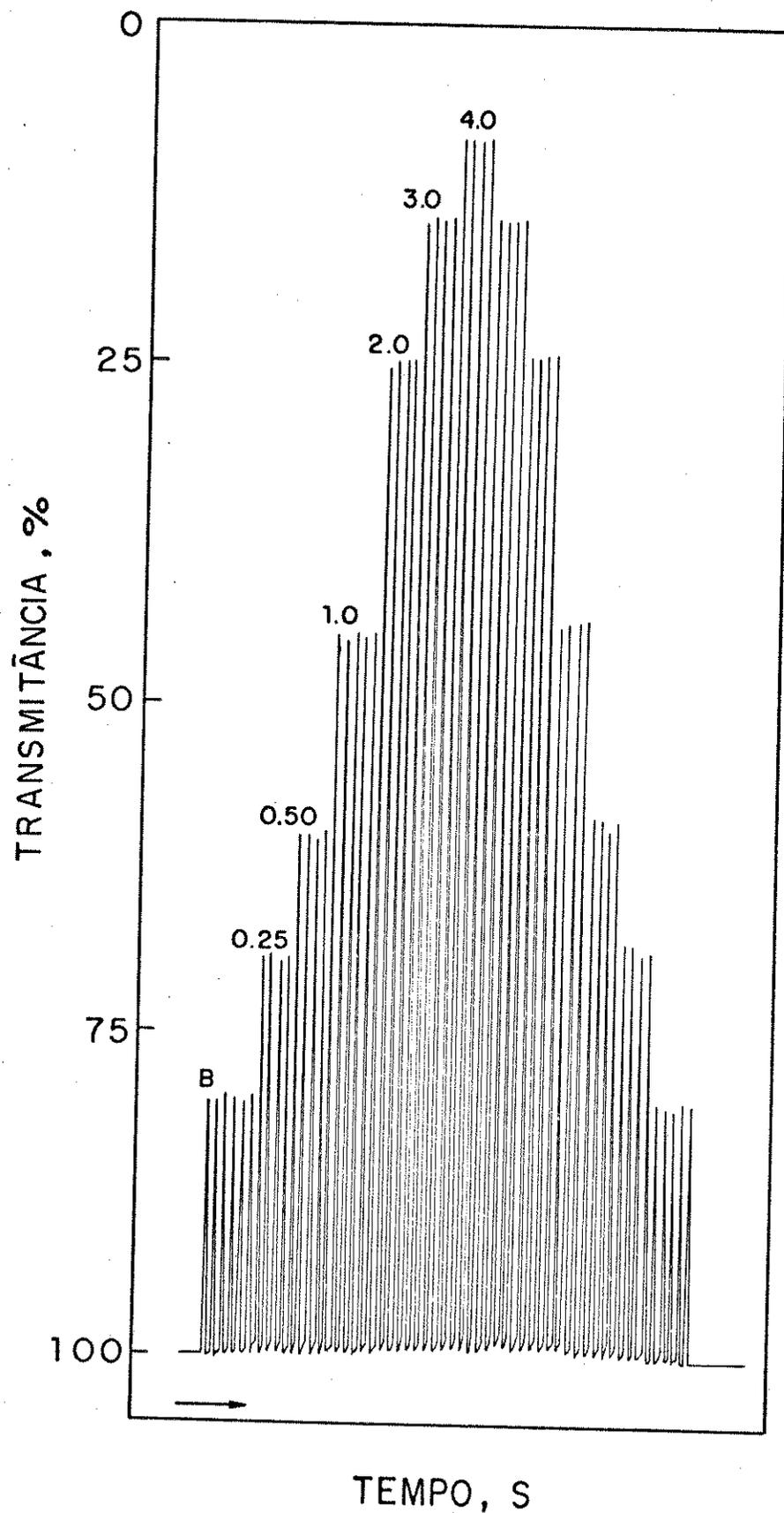


Figura IV.11: Sinais típicos de uma curva de calibração para o boro, usando o sistema de AFCM. Ls: 350 µl. Solução de azometina-H: 0,60% m/V em 2,0 m/V de ácido ascórbico. Solução Tampão: 14,0 m/V de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em 5% m/V de EDTA em pH  $8,1 \pm 0,2$ . Tempo de residência: 280s. Concentrações de boro em  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

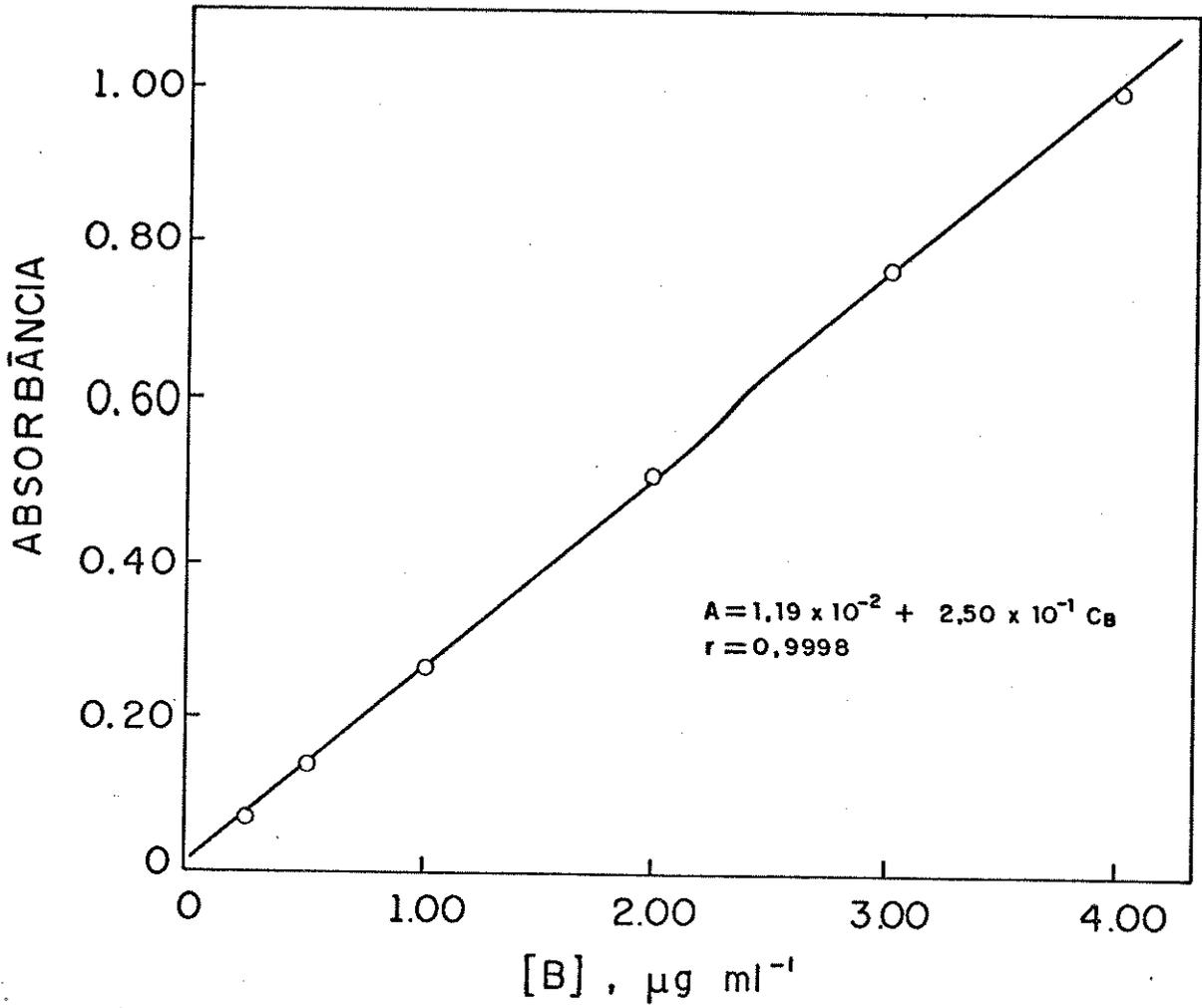


Figura IV.12: Curva de calibração obtida a partir dos sinais registrados da figura IV.11.

Tabela IV.1: Estudo das vazões empregadas para a sucção e para o bombeamento da solução reagente e do tampão (ver figura III.1)

Vazões ( $\text{ml min}^{-1}$ )			Absorbância para
Sucção	Reagente	Tampão	$1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de B
3,0	0,5	0,5	0,263
3,0	0,5	0,4	0,184
3,0	0,7	0,5	0,331
2,7	0,5	0,5	0,290
2,7	0,5	0,4	0,270
2,7	0,7	0,5	0,303

O desvio padrão relativo (DPR), calculado a partir de dez determinações em replicata, variou de 1,0% para o nível de  $0,50 \mu\text{g ml}^{-1}$  até 1,4% para o nível de  $4,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ , com um DPR mínimo de 0,9% para o nível de  $1,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Os valores de DPR observados são praticamente constantes em toda a faixa testada. O limite de detecção obtido nestas condições foi de  $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$  e foi calculado em relação ao sinal do branco, considerando-se três vezes o seu desvio padrão, correspondendo a um nível de confiança de aproximadamente 90%, segundo as recomendações da IUPAC<sup>(77)</sup>.

O grau de tolerância da reação, entre a azometina-H e o boro, frente a alguns elementos, foi verificado usando o sistema de AFCM descrito na figura III.6 (p. 50). Foram selecionados para este estudo os elementos mais comumente presentes nas plantas<sup>(40,52,68)</sup>, que se encontram agrupados na tabela IV.2, com suas respectivas concentrações máximas estimadas em extratos de plan-

tas. Estes dados foram estimados tomando-se como base os resultados das análises de rotina destes elementos realizadas no Instituto Agronômico de Campinas. A partir destes valores foram escolhidas três concentrações distintas para cada elemento, que foram então testadas com soluções padrão de boro de concentrações 0,50, 1,00 e 2,00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Tabela IV.2: Relação dos elementos testados no sistema de AFCM, para a determinação das interferências na reação de boro com azometina-H. As formas químicas utilizadas estão citadas entre parênteses.

Elemento Testado	Concentração Máxima Estimada no Extrato ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Alumínio (Al <sup>3+</sup> )	50
Ferro (Fe <sup>3+</sup> )	50
Cobre (Cu <sup>2+</sup> )	15
Zinco (Zn <sup>2+</sup> )	5
Manganês (Mn <sup>2+</sup> )	25
Magnésio (Mg <sup>2+</sup> )	250
Cálcio (Ca <sup>2+</sup> )	500
Potássio (K <sup>+</sup> )	500
Sódio (Na <sup>+</sup> )	100
Nitrogênio (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	500
Enxofre (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	500

Como se poderia prever<sup>(34,52)</sup>, os elementos ferro, cobre, alumínio, cálcio e magnésio interferem na determinação de boro com azometina-H. Os resultados obtidos nestes testes, usando o sistema de AFCM, estão agrupados nas tabelas IV.3 a IV.7. O grau de interferência é determinado pelo fator de interferência (FI), que é definido como a razão entre o valor da absorbância da solução contendo azometina-H, boro e interferente ( $A_{BI}$ ) e o valor da absorbância da solução contendo azometina-H e boro, sem interferente ( $A_B$ ). Todos os valores de absorbância foram determinados contra o valor do branco. Um fator de interferência igual a 1,00 indica que não há interferência, com um erro relativo máximo de 2%, enquanto que os fatores maiores e menores que 1,00 significam, respectivamente, um aumento e uma diminuição no sinal esperado.

Os íons de ferro ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) apresentam uma coloração castanha-clara quando presentes em uma solução de azometina-H contendo boro. Pode-se verificar através da tabela IV.3 que, mesmo na presença de 5% de EDTA, não se consegue eliminar a interferência causada pelo ferro, principalmente quando o boro se encontra em baixa concentração (exemplo:  $0,50 \mu g ml^{-1}$ ). O nível de interferência deste elemento não é apenas uma função da razão das concentrações relativas do ferro e do boro, mas também dos níveis reais dos mesmos presentes na amostra. Como exemplo, pode-se observar na tabela IV.3, que uma razão  $Fe/B = 100$  fornece um FI de 8,87 para concentrações de  $0,50 \mu g ml^{-1}$  para o boro e  $0,50 \mu g ml^{-1}$  para o ferro, e um FI de 5,61 quando os níveis são de 1,00 e  $100 \mu g ml^{-1}$  para o boro e ferro, respectivamente.

O cobre também interfere consideravelmente na reação entre o boro e a azometina-H, produzindo uma coloração castanha amarelada, conforme a descrição da tabela IV.4. A mesma relação en-

Tabela IV. 3: Interferência do ferro na determinação de boro com azometina-H, usando o sistema AFCM.  $R_f = 1,98^{(*)}$

$C_{Fe^{3+}}^{(**)}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		10	50	100
Boro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	EDTA (% m/V)	Fator de Interferência (FI)		
0,50	0	6,64	8,87	10,21
	1	1,30	1,46	1,62
	3	1,22	1,32	1,48
	5	1,15	1,28	1,44
1,00	0	3,43	5,01	5,61
	1	1,07	1,11	1,18
	3	1,04	1,09	1,14
	5	1,00	1,07	1,12
2,00	0	2,89	3,09	3,29
	1	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00

(\*) Os valores de  $R_f$ , em todos os casos, foram obtidos previamente a cada estudo dos interferentes

(\*\*) O ferro é medido como  $Fe^{2+}$  e/ou  $Fe^{3+}$ , indistintamente, dada a presença de ácido ascórbico no meio da reação.

Tabela IV. 4: Interferência do cobre na determinação de boro com azometina-H, usando o sistema AFCM.  $R_f = 1,99$

$C_{Cu^{2+}}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		5	15	30
Boro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	EDTA (% m/V)	Fator de Interferência (FI)		
0,50	0	2,70	6,93	10,99
	1	1,07	1,12	1,12
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00
1,00	0	1,84	4,01	5,90
	1	1,04	1,04	1,04
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00
2,00	0	1,40	2,37	2,54
	1	1,04	1,04	1,04
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00

tre a razão das concentrações relativas apresentadas pelo ferro também pode ser observada com o cobre. Em uma razão  $\text{Cu/B} = 30$ , nota-se em  $\text{FI} = 6,93$  para as concentrações de  $0,50 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o boro e  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o cobre, e um  $\text{FI} = 5,90$  para os níveis de  $1,00$  e  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o boro e o cobre, respectivamente. A ocorrência deste fenômeno pode também ser observado para o mesmo sistema químico em AIF, por dedução, a partir dos resultados apresentados por Krug *et alli* <sup>(68)</sup>. Este comportamento poderia ser explicado supondo-se que os elementos cobre e ferro estariam agindo como catalisadores na reação de condensação da azometina-H, de modo semelhante ao boro, como proposto por Capelle <sup>(34)</sup>. Neste caso, a velocidade de deslocamento do equilíbrio no sentido da formação da azometina-H seria uma função da concentração de cada espécie química envolvida na reação, bem como uma função da eficiência do mecanismo de catálise para cada interferente. Entretanto a confirmação desta hipótese necessitaria de experiências adicionais, dada a complexidade do sistema químico envolvido.

O alumínio é também um interferente na reação da azometina-H com o boro, formando uma coloração amarela intensa. Porém, o comportamento observado para o ferro e o cobre não foi verificado para o alumínio, cujos resultados estão descritos na tabela IV.5.

As interferências causadas tanto pelo cobre como pelo alumínio podem ser eliminadas com a adição de 3% m/V de EDTA na solução tampão, o que não ocorre para o ferro.

Os elementos cálcio e magnésio podem interferir neste tipo de análise por formação de precipitado com o sal empregado no tampão. Os precipitados formados seriam, provavelmente, o hidrogenofosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e o hidrogenofosfato de magnésio ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), ambos pouco solúveis <sup>(1)</sup>. De acordo com

Tabela IV. 5: Interferência do alumínio na determinação de boro com azometina-H, usando o sistema AFCM.  $R_f = 1,98$

$C_{Al^{3+}}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		10	50	100
Boro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	EDTA (% m/V)	Fator de Interferência (FI)		
0,50	0	1,06	1,42	1,78
	1	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00
1,00	0	1,06	1,40	1,77
	1	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00
2,00	0	1,07	1,23	1,35
	1	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00

as tabelas IV.6 e IV.7, pode-se observar que não se consegue realizar as medidas espectrofotométricas em presença de valores de concentração altos do cálcio e do magnésio se a solução tampão contiver menos que 3% de EDTA. Em concentrações iguais ou maiores que 3%, o EDTA pode causar um efeito contrário ( $FI < 100$ ), provavelmente pelo fato do mesmo formar complexos com  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ .

Os demais elementos testados, tais como o sódio ( $Na^+$ ,  $2000 \mu g ml^{-1}$ ), potássio ( $K^+$ ,  $1000 \mu g ml^{-1}$ ), manganês ( $Mn^{2+}$ ,  $50 \mu g ml^{-1}$ ), zinco ( $Zn^{2+}$ ,  $30 \mu g ml^{-1}$ ), nitrogênio como  $NO_3^-$  ( $1000 \mu g ml^{-1}$ ) e enxofre como  $SO_4^-$  ( $1000 \mu g ml^{-1}$ ) não apresentaram interferências na reação entre o boro e a azometina-H, dentro de um erro relativo de 2%, em nenhuma das concentrações estudadas. Os valores citados entre parênteses indicam as concentrações máximas estudadas para cada um destes elementos.

De um modo geral, considerando-se os resultados obtidos e os valores estimados para as concentrações limites destes elementos em plantas, a adição de 5% m/V de EDTA no tampão pode corrigir satisfatoriamente as interferências químicas do método proposto. Entretanto é conveniente ressaltar que se o ferro estiver presente em níveis altos, não compatíveis com a metodologia proposta, devem-se procurar meios de se reduzir a sua concentração, antes de se efetuar a determinação do boro. Alternativamente, pode-se sugerir a adição de uma quantidade maior de EDTA ao tampão, visto que, aparentemente, este agente mascarante não tem efeito significativo sobre o sinal analítico de AFCM.

Na falta de padrões certificados (CRM: "Certified Reference Material"), a exatidão do método de AFCM para a determinação de boro foi avaliada através de amostras de plantas fornecidas pelo "Plant Sample Exchange Programme" (PSEP) da Universidade de

Tabela IV. 6: Interferência do cálcio na determinação de boro com azometina-H, usando o sistema AFCM.  $R_f = 1,98$

$C_{Ca^{2+}}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		100	500	1000
Boro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	EDTA (% m/V)	Fator de Interferência (FI)		
0,50	0	7,73	(a)	(a)
	1	1,11	(a)	(a)
	3	1,00	0,92	0,86
	5	1,00	0,89	0,73
1,00	0	(a)	(a)	(a)
	1	1,10	(a)	(a)
	3	1,00	0,93	0,91
	5	1,00	0,90	0,80
2,00	0	(a)	(a)	(a)
	1	1,00	(a)	(a)
	3	1,00	0,96	0,89
	5	1,00	0,95	0,85

(a) Estes sinais não foram registrados, devido a formação de precipitado.

Tabela IV. 7: Interferência do magnésio na determinação de boro com azometina-H, usando o sistema AFCM. Rf = 1,99

$C_{Mg^{2+}}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		100	250	500
Boro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	EDTA (% m/V)	Fator de Interferência (FI)		
0,50	0	1,00	2,07	(a)
	1	1,00	1,65	(a)
	3	1,00	0,94	0,92
	5	0,97	0,88	0,74
1,00	0	1,06	(a)	(a)
	1	1,00	(a)	(a)
	3	1,00	1,00	0,94
	5	1,00	0,92	0,81
2,00	0	1,23	(a)	(a)
	1	1,21	(a)	(a)
	3	1,00	0,96	0,93
	5	1,00	0,95	0,88

(a) Estes sinais não foram registrados devido a formação de precipitado.

Wageningen (Holanda) <sup>(78)</sup>. Cerca de 190 laboratórios participam deste programa, onde cada um recebe amostras e as analisam para os elementos de interesse, de acordo com seus procedimentos de rotina. No caso do boro, somente 56 destes laboratórios efetuaram a análise. Os resultados obtidos são então publicados e cada laboratório participante pode comparar seus dados aos demais.

Para este trabalho, cada amostra de planta testada foi dividida em três porções de 250 mg cada, e posteriormente, tratadas independentemente, segundo o procedimento descrito no Capítulo III. As soluções resultantes foram injetadas no sistema de AFCM em quintuplicata, resultando em um total de quinze injeções por amostra. Os resultados finais, apresentados na tabela IV.8, estão descritos como os valores médios de concentração e seus respectivos desvios padrão, obtidos através do tratamento de dados convencionais para as medidas <sup>(79)</sup>. Estes valores médios são comparados na tabela IV.8, aos resultados encontrados com o procedimento estático convencional usando azometina-H e os dados relatados pelo PSEP.

Os valores obtidos nas condições dinâmicas da AFCM são concordantes com aqueles encontrados com o método estático da azometina-H. Por comparação direta, os resultados da AFCM para a determinação de boro são iguais ou maiores aos valores das medianas relatados pelo PSEP, mas todos se encontram no intervalo aceito, de acordo com o procedimento de rejeição empregado por este Programa. Observe que, mesmo para a amostra 757, que apresenta o maior desvio absoluto da mediana, os resultados foram aceitos, apesar dos níveis altos de concentração de outros elementos interferentes (1078, 12 e 1390 mg Kg<sup>-1</sup> para o ferro, cobre e alumínio, respectivamente).

Os critérios de rejeição do PSEP <sup>(78)</sup>, por envolverem da

Tabela IV.8: Determinação do boro em extratos de plantas, usando o sistema de AFCM e o método estático. Estudo comparativo usando amostras de plantas do PSEP.

Amostra (a)	Método AFCM		Método Estático (c)		Resultados do PSEP (mg Kg <sup>-1</sup> )		
	(µg ml <sup>-1</sup> )	(mg Kg <sup>-1</sup> )	(mg Kg <sup>-1</sup> )	mediana	Intervalo Aceito (d)	Intervalo Observado (e)	
569 - Grão de trigo	0,05 ± 0,01	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,4	2	0 - 5	0 - 10	
757 - Espinafre	1,00 ± 0,01	40,0 ± 0,4	39,8 ± 0,4	34	27 - 41	14 - 42	
810 - Basela alba (b)	0,87 ± 0,01	34,8 ± 0,4	34,9 ± 0,4	32	22 - 42	11 - 42	
822 - Cenoura	0,64 ± 0,01	25,6 ± 0,4	25,5 ± 0,4	21	14 - 29	9 - 29	
833 - Pastagem	0,25 ± 0,01	10,0 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9	6 - 12	4 - 24	

(a) Amostras de Setembro - Outubro de 1986

(b) Espécie de Trepadeira

(c) Método estático (convencional) empregado no IAC<sup>(70)</sup> para determinação de boro com Azometina-H

(d) Intervalo dos valores aceitos pelo PSEP

(e) Intervalo dos valores reportados pelo PSEP

dos de diferentes procedências e diversos procedimentos analíticos, utilizam a mediana dos valores encontrados e um desvio, calculado a partir da mediana dos desvios absolutos, em lugar da média e do desvio padrão, geralmente empregados em tratamentos estatísticos convencionais<sup>(79)</sup>. A tabela IV.9 descreve o procedimento usado para o critério de rejeição e o compara ao procedimento clássico<sup>(78)</sup>.

Tabela IV.9: Descrição e comparação entre o procedimento clássico e o proposto pelo PSEP para a rejeição de resultados<sup>(78)</sup>

	Procedimento Clássico	Procedimento proposto - PSEP
Localização	Média = $\bar{x}$ $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$	Mediana = $m = \text{med}$ $m = \text{med} \{x_1, \dots, x_n\}$
Desvio (a)	$S = \frac{1}{(n-1)^{1/2}} \{\sum  x_i - \bar{x} ^2\}^{1/2}$	$S' = f_I \cdot \text{mda}$
Critério de Rejeição	$\frac{ x_i - \bar{x} }{2} > 2$	$\frac{ x_i - m }{S'} > 2$

(a) - No cálculo do desvio  $S'$ ,

$$f_I = (0,7722 + 1,604/n) * t_{n-1}(0,025)$$

onde  $n$  = número de determinações e

$t_{n-1}(0,025)$  = valor de "Student", com 95% de probabilidade, para  $n-1$  graus de liberdade e

$\text{mda}$  = mediana dos desvios absolutos, ou seja:

$$\text{mda} = \text{med} \{|x_i - m|\}$$

Sabe-se que este procedimento não seria o mais adequado, estatisticamente, para se testar a exatidão do método de AFCM, mas isto não invalida o uso da comparação direta para se determinar a confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que todos os valores encontrados através da AFCM teriam sido aceitos pelo critério de rejeição do PSEP.

## CAPÍTULO V

## CONCLUSÃO

As condições experimentais de rotina encontradas para a determinação espectrofotométrica de boro, com azometina-H, em extratos de plantas, usando o sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado, podem ser resumidas como a seguir:

- Carregador: HCl 0,10 M
- Solução de azometina-H 0,60% m/V em 2,0% m/V de ácido ascórbico
- Solução tampão: 14,0% m/V de hidrogenofosfato de amônio, contendo 5% m/V de EDTA (como agente mascarante) em pH  $8,1 \pm 0,2$ .
- Soluções padrão para a curva de calibração: 0,25 a  $4,00 \mu\text{g ml}^{-1}$  em ácido clorídrico 0,10M
- Volume injetado: 350  $\mu\text{l}$
- Tempo de residência: 280 s
- Tempo de amostragem: 20 s
- Tempo de descarga de amostra: 10 s
- Volume da cela de fluxo: 80  $\mu\text{l}$
- Comprimento de onda: 420 nm
- Velocidade de análise: 120 determinações por hora
- Desvio padrão relativo: entre 1,0% ( $0,50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e 1,4% ( $4,00 \mu\text{g ml}^{-1}$ )
- Limite de detecção:  $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$

Estes valores podem ser alterados e/ou adaptados para outros tipos de matrizes, onde a própria sensibilidade pode ser modificada, de acordo com as necessidades, através da variação das condições experimentais discutidas no Capítulo IV.

Para fins de comparação, resumiu-se abaixo alguns parâmetros relevantes dos métodos que empregam a azometina-H, na determinação espectrofotométrica de boro em plantas, o que permitirá ao leitor a escolha do método que lhe for mais conveniente.

Método	Manual <sup>(70)</sup>	AFCS <sup>(52)</sup>	FIA <sup>(68)</sup>	AFCM
Parâmetro	(IAC)	(AutoAnalyzer)		
Sensibilidade (UA/ $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,20	0,10	0,08	0,25
Velocidade de Determinação	70 dia <sup>-1</sup>	30 h <sup>-1</sup>	60 h <sup>-1</sup>	120 h <sup>-1</sup>
Consumo de Azometina-H (mg por determinação)	9,0	5,5	2,0	2,1
Tempo de Reação(s)	1800	480	40	280
Precisão	-	-1%	-1%	-1%

Pode-se verificar entretanto, que o sistema de AFCM apresentou resultados mais satisfatórios, demonstrando que este sistema tem um melhor desempenho que os demais, principalmente quando empregam-se reações cineticamente lentas. A sensibilidade

obtida com o método de AFCM é a maior dentre os métodos de fluxo, sem prejuízo da velocidade de determinação. Além disto, este método utiliza os dispositivos simples, também usados em AIF, o que reduz em muito o custo operacional.

## APÊNDICE 1

Métodos automáticos são aqueles que usam combinações de dispositivos mecânicos e instrumentais para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o trabalho humano e facilitar a performance de um dado processo, no qual pelo menos a operação principal é controlada através de um sistema de retro-alimentação ("feed-back"), sem a intervenção humana. Comparativamente, o termo mecanização é a melhor designação para certos procedimentos que não se incluem na definição acima. O método mecanizado é definido como o que utiliza dispositivos mecânicos para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o trabalho humano. Estes conceitos foram definidos pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)<sup>(46)</sup>.

## APÊNDICE 2

## SOLUÇÕES - TAMPÃO

## Tampão Hidrogenosfosfato de Amônio

- Soluções de hidrogenofosfato de amônio, com concentrações variáveis entre 10,0 e 25,0% m/V, foram preparadas com água e usadas como tampões no estudo da determinação de boro com o sistema de AFCM. A tabela a seguir indica o valor de pH obtido para cada concentração utilizada.

Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (% m/V)	pH
10	7,98
12	8,01
13	8,02
14	8,05
15	8,09
16	8,10
20	8,11
25	8,12

## Tampão segundo Sørensen

- Solução A (hidrogenofosfato de sódio (1/15M)): pesou-se 11,866g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck-PA) e completou-se o volume a um litro em balão volumétrico.
- Solução B (dihidrogenofosfato de potássio (1/15 M)): pesou-se 9,073 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e completou-se o volume a um litro em balão volumétrico.

Para a obtenção das soluções tampão fez-se a mistura de ambas as soluções A e B nas proporções descritas na tabela a seguir, de modo a obter os valores mencionados<sup>(76)</sup>.

pH	Volume (ml)	
	Solução A	Solução B
7,0	61,2	38,8
7,2	72,1	27,9
7,5	84,3	15,7
7,8	91,4	8,6
8,0	94,5	5,5

## SOLUÇÕES DE INTERFERENTES

As soluções-estoque de interferentes foram preparadas dissolvendo-se uma quantidade conveniente do sal correspondente ao íon a ser testado em ácido clorídrico 0,10M, diluindo-se em seguida a solução resultante a 500 ml, com o mesmo ácido. As quantidades utilizadas em cada caso estão descritas na tabela abaixo.

Íon Interferente	massa do sal (g)	$C_{\text{íon}}^{(*)}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Fe <sup>3+</sup>	0,4838	200
Cu <sup>2+</sup>	0,0805	60
Al <sup>3+</sup>	0,8948	200
Zn <sup>2+</sup>	0,0625	60
Mn <sup>2+</sup>	0,1801	100
Ca <sup>2+</sup>	3,6681	2000
Mg <sup>2+</sup>	4,1817	1000
K <sup>+</sup>	1,9068	2000
Na <sup>+</sup>	5,0849	4000
N(como NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	7,2180	2000
S(como SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	5,4344	2000

(\*) Concentração analítica da solução-estoque do íon testado.

## APÊNDICE 3

Para o cálculo dos diversos parâmetros estudados nesta tese e das concentrações das amostras, através das curvas de calibração, desenvolveu-se um programa em BASIC para um computador de bolso SHARP PC 1211/RP. O programa se encontra dividido em dois subprogramas que empregam uma sub-rotina responsável pela transformação das alturas de pico em absorbância, descontando o valor do branco. O subprograma "A" efetua os cálculos de regressão linear e o "B" calcula as concentrações das amostras empregando a curva padrão fornecida pelo subprograma "A". A listagem do programa está descrita a seguir.

```

10:"A":CLEAR :
  PRINT "CURVA
  PADRAO "
11:PRINT " "
20:FOR A=17TO 2
  1
30:A(A)=0
40:NEXT A
50:H=189.5:
  GOSUB 500
60:INPUT "NUM D
  E PONTOS=" :
  G
70:FOR P=1TO 0
80:INPUT "CONC(
  PPM)=" :H
90:PRINT "PPM =
  " :USING "##
  .###^":H:
  GOSUB 600
100:A(30)=3:A(31
  )=INT (A(29)
  *10^A(30)+.5
  )/10^A(30)
110:PRINT "ABS =
  " :A(31)
120:Q=Q+H
130:R=R+A(31)
140:S=S+N*N
150:T=T+N*A(31)
160:U=U+A(31)*A(
  31)
170:NEXT P
180:Q=Q/O:R=R/O
190:S=S-O*Q*Q:T=
  T-O*Q*R:U=U-
  O*R*R
200:V=T/S:W=R-V*
  Q:X=T/J(S*U
210:PRINT "C.L.=
  " :W
220:PRINT "C.A.=
  " :V
230:PRINT "C.R.=
  " :X
240:END
300:"B":H=0:
  PRINT "CALC.
  CONC."
310:FOR A=22TO 3
  3
320:A(A)=0
330:NEXT A
333:H=189.5
340:INPUT "COEF.
  LIN.=" :H
350:INPUT "COEF.
  ANG.=" :V
360:GOSUB 500
370:INPUT "NUM.D
  E DETERM.=" :
  Y
380:FOR Z=1TO Y
390:PRINT "DET.N
  Umero":USING
  "###." :Z:
  GOSUB 600
400:A(27)=((A(29
  )-W)/V)
410:A(32)=3:A(33
  )=INT (A(27)
  *10^A(32)+.5
  )/10^A(32)
420:PRINT "PPM =
  " :USING "##
  .###^":A(33)
430:NEXT Z
440:END
500:L=0:REM SUBR
  /BRANCO
510:INPUT "NUM D
  E BRANCOS=" :
  J
520:FOR K=1TO J
530:INPUT "H(BRA
  NCO)(MM)=" :G
540:L=L+G
550:NEXT K
560:M=L/J:G=M
570:I=-LOG ((H-G
  )/H)
580:PRINT "BRN.=
  " :I
590:RETURN
600:A=0:D=0:REM
  SUBR/CALCULO
610:INPUT "NUM D
  E PICOS":A
620:FOR B=1TO A
630:INPUT "H(PIC
  O)(MM)=" :C
640:D=D+C
650:NEXT B
660:E=D/A:A(28)=
  -LOG ((H-E)/
  H)
670:A(29)=A(28)-
  I
680:RETURN

```

## BIBLIOGRAFIA

1. WEAST, R.C.. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 58ª edição, Editora CRC-Press, Cleveland-EUA, 1977-1978, p.B-8.
2. BRAMAN, R.S.. "Boron" IN: KOLTHOFF, I.M. e ELVING, J.P. (ed). Treatise on Analytical Chemistry, parte II, volume 10, John Wiley & Sons, Inc., 1978, p. 1-101.
3. KRAUSKOPF, K.B.. "Geochemistry of Micronutrients", IN: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L.. Micronutrients in Agriculture, Soil Science Society of America Inc., Madison-EUA, 1972, p. 7-22.
4. LINDSAY, W.L.. "Inorganic Phase Equilibria in Soils" IN: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L.. Micronutrients in Agriculture, Soil Science Society of America Inc., Madison-EUA; 1972, p. 23-30.
5. FERREIRA, A.B.H.. Novo Dicionário da Língua Portuguesa-Aurélio, 2ª edição, Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1986, p. 676.
6. GRASSERBAUER, M.; STINGEDER, G.; GUERRERO, E. e FALLMANN, W.. "Quantitative Distribution Analysis for Boron and Arsenic in Silicon-Semiconductors". *Mikrochim. Acta.* 1981, II (5-6): 469-482.
7. WINDHOLZ, M.. The Index Merck, 9ª edição, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., EUA, 1976, p. 173.
8. UNDERWOOD, E.J.. Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4ª edição, Academic Press, Nova York - EUA, 1977, p. 436.

9. SHORROCKS, V.M.. Boron Deficiency: Its Prevention and Cure, Technical Service and Development Department, Borax Consolidated Limited, Londres-Inglaterra, 1985.
10. BRADFORD, G.R.. "Boron" IN: CHAPMAN, H.D. (ed), Diagnostic Criteria for Plants and Soils, Quality Printing Company, Inc., Texas, 1965, p-33-61.
11. PASQUINI, C. e de OLIVEIRA, W.A.. "Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia, and Phosphorus". *Anal. Chem.* 1985, 57: 2575-2579.
12. CALLISON, J.A.. "The Distribution of Boracic Acid Among Plants". *Anal. Chem.* 1890, 4: 191-197.
13. BRENCHLEY, W.E.. "On the Action of Certain Compounds of Zinc, Arsenic, and Boron on the Growth of Plants". *Ann. Botany* (London). 1914, 28: 283-301.
14. SOMMER, A.L.. "The Search for Elements Essential in Only Small Amounts for Plant Growth". *Science*. 1927, 66: 482-484.
15. FERRI, M.G.; de MENEZES, N.L. e SCANAVACCA, W.R.M.. Glossário Ilustrado de Botânica, 1ª edição, Livraria Nobel, São Paulo, 1978.
16. MENGEL, K. e KIRKBY, E.A.. Principles of Plant Nutrition, International Potash Institute, Suíça, 1978.
17. RAJARATNAN, J.A.; LOWRY, J.B.; AVADHANI, P.N. e CORLEY, R.H. V.. "Boron: Possible Role in Plant Metabolism". *Science*. 1971, 172: 1142-1144.
18. REEVE, E. e SHIVE, J.W.. "Potassium-Boron and Calcium Boron Relationships in Plant Nutrition". *Soil. Sci.* 1944, 57: 1-14.

19. TIFFIN, L.O., "Translocation of Micronutrients in Plants"  
IN: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L.. Micronu-  
trients in Agriculture, Soil Science Society of America Inc.,  
MADISON-EUA, 1972.
20. LOHSE, G.. "Microanalytical Azomethine-H Method for Boron De-  
termination in Plant Tissue". *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.*  
1982, 13(2): 127-134.
21. COHEN, M.S. e LEPPER Jr., R.. "Effect of Boron on Cell Elon-  
gation and Division in Squash Roots". *Plant Physiol.* 1977,  
59: 884-887.
22. OERTLI, J.J. e KOHL, H.C.. "Some Considerations about the  
Tolerance of Various Plant Species to Excessive Supplies of  
Boron". *Soil Sci.* 1961, 92: 243-247.
23. WATSON, M.E.. "Interlaboratory Comparison in the Determina-  
tion of Nutrient Concentrations of Plant Tissue". *Commun.*  
*Soil Sci. Plant Anal.* 1981, 12(6): 601-617.
24. MATHIS, W.T.. "Spectrochemical Analysis of Plant Material  
Using Spark Excitation". *Anal. Chem.* 1953, 25(6): 943-945.
25. MATHIS, W.T.. "Report on Spectrographic Methods: Spectrogra-  
phic and Flame Photometric Standards". *J. Assoc. Off. Anal.*  
*Chem.* 1953, 36: 411-415.
26. SMITH, F.M.; SCHRENK, W.G. e KING, H.H.. "Spectrographic De-  
termination of Boron in Plant Tissue". *Anal. Chem.* 1948,  
20: 941-944.
27. DeBOLT, D.C.. "Multi-element Emission-Spectroscopic Analysis  
of Plant Tissue Using d.c. Argon Plasma Source". *J. Assoc.*  
*Off. Anal. Chem.* 1980, 63(4): 802-805.

28. ISAAC, R.A. e JOHNSON, W.C.. "Elemental Analysis of Plant Tissue by Plasma-Emission Spectroscopy: Collaborative Study". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68(3): 499-505.
29. GOWARD, G.W. e WIEDERKEHR, V.R.. "Sensitivities and Other Properties of Reagents for the Spectrophotometric Determination of Boron". *Anal. Chem.*, 1963, 35: 1542-1546.
30. HORWITZ, W.. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Washington, 1984.
31. DIBLE, W.T.; TRUOG, E. e BERGER, K.C.. "Boron Determination in Soils and Plants Simplified Curcumin Procedure". *Anal. Chem.*, 1954, 26(2): 419-422.
32. UPPSTROM, L.R.. "A Modified Method for Determination of Boron with Curcumin and a Simplified Water Elimination Procedure". *Anal. Chim. Acta.*, 1968, 43: 475-486.
33. WIKNER, B.. "Boron Determination in Natural Waters with Curcumin using 2,2-dimethylhexane-1,3-diol to Eliminate Interferents". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 1981, 12(7): 697-709.
34. CAPELLE, R.. "Colorimetric Micro-determination of Boron in Aqueous Media with derivatives of H and K-acids Containing Azo-or Imino-Groups". *Anal. Chim. Acta.* 1961, 24(6): 555-572.
35. KORENMAN, I.M. e SHEYANOVA, F.R.. "A New Group of Reagents for boric acid". *J. Anal. Chem. USSR, translated edition.* 1952, 7: 145-147.
36. CAPELLE, R.. "Colorimetric Micro-determination of boron in Steel using Azomethine-H". *Anal. Chim. Acta.* 1961, 25(1): 59-68.

37. SHANINA, T.M.; GEL'MAN, N.E. e MIKHAILOVSKAYA, V.S.. "Quantitative Analysis of Heteroorganic Compounds: Spectrophotometric Micro-determination of Boron". *J. Anal. Chem. USSR, translated edition*.. 1967, 22: 363-367.
38. WOLF, B.. "The Determination of Boron in Soil Extracts, Plant Materials, Composts, Manures, Water, and Nutrient Solutions". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*.. 1971, 2: 363-374.
39. WOLF, B.. "Improvements in the Azomethine-H Method for the Determination of Boron". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*.. 1974, 5: 39-44.
40. JOHN, M.K.; CHUAH, H.H. e NEUFELD, J.H.. "Application of Improved Azomethine-H Method to the Determination of Boron in Soils and Plants". *Anal. Letters*. 1975, 8(8): 559-568.
41. HATCHER, J.T. e WILCOX, L.V.. "Colorimetric Determination of Boron Using Carmine". *Anal. Chem.*..1950, 22: 567-569.
42. SIPPOLA, J. e ERVIÖ, R.. "Determination of Boron in Soils and Plants by the Azomethine-H Method". *Finn. Chem. Letters*. 1977, (4-5): 138-140.
43. GAINES, T.P. e MITCHELL, G.A.. "Boron Determination in Plant Tissue by the Azomethine-H Method". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*.. 1979, 10(8): 1099-1108.
44. GARCIA, I.L.; CORDOBA, M.H. e PEDREÑO, C.S.. "Sensitive Method for the Spectrophotometric Determination of Boron in Plants and Waters Using Crystal Violet". *Analyst*. 1985, 110(10): 1259-1262.
45. AZNAREZ, J. e MIR, J.M.. "Spectrophotometric Determination of Boron". *Analyst*. 1985, 110(1): 61-64.

46. FOREMAN, J.K. e STOCKWELL, P.B.. Automatic Chemical Analysis, 1ª edição, John Wiley & Sons Inc., Londres, 1975.
47. SKEGGS, Jr., L.T.. "An Automatic Method for Colorimetric Analysis". *Am. J. Clin. Path.*. 1957, 28: 311-322.
48. PASQUINI, C.. "Instrumentação e Metodologia para Análise em Fluxo Contínuo, Desenvolvimento de um Entalpímetro, de Fluxo, de um Sistema Monossegmentado e Construção de um Circuito Retentor de Picos". Tese de Doutorado. Instituto de Química - UNICAMP. Campinas. 1984.
49. SNYDER, L.R.. "Continuous-Flow Analysis: Present and Future". *Anal. Chim. Acta.* 1980, 114: 3-18.
50. SNYDER, L.R. e ADLER, H.J.. "Dispersion in Segmented Flow through Glass Tubing in Continuous-Flow Analysis: The Ideal Model". *Anal. Chem.*. 1976, 48(7): 1017-1022.
51. SNYDER, L.R. e ADLER, H.J.. "Dispersion in Segmented Flow through Glass Tubing in Continuous-Flow Analysis: The Nonideal Model". *Anal. Chem.*. 1976, 48(7): 1022-1027.
52. BASSON, D.W.; BÖHMER, R.G. e STANTON, D.A.. "An Automated Procedure for the Determination of Boron in Plant Tissue". *Analyst.* 1969, 94: 1135-1141.
53. BASSON, W.D.; PILLE, P.P. e DU PREEZ, A.L.. "Automated *in situ* Preparation of Azomethine-H and the Subsequent Determination of Boron in Aqueous Solutions". *Analyst.* 1974, 99: 168-170.
54. PORTER, S.R.; SPINDLER, S.C. e WIDDOWSON, A.E.. "An Improved Automated Colorimetric Method for the Determination of Boron in Extracts of Soil, Soil-Less Peat-Based Composts, Plant Ma

- terials and Hidroponic Solutions with Azomethine-H". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1981, 12(5): 461-473.
55. WILLIS, A.L.. "Automated Procedure for the Analysis of Boron in Plant Tissue". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1970 1(4): 205-211.
56. LIONELL, L.J.. "An Automated Method for the Determination of Boron in Sewage, Sewage Effluents and River Waters". *Analyst.* 1970, 95: 194-199.
57. OSTLING, G.. "A Simplified Automated Curcumin Method for the Determination of Boron in Sea Water". *Anal. Chim. Acta.* 1975, 78: 507-512.
58. OGNER, G.. "Automated Determination of Boron in Plants". *Analyst.* 1980, 105: 916-919.
59. OGNER, G.. "Automated Determination of Boron in Water Samples and Soil Extracts". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1980, 11(12): 1209-1219.
60. STEWART, K.K.. "Flow Injection Analysis: A review of its Early History". *Talanta.* 1981, 28: 789-797.
61. RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.. "Flow Injection Analysis. Part I. A New Cencept of Fast Continuous Analysis". *Anal. Chim. Acta.* 1975, 78: 145-157.
62. HANSEN, E.H. e RUZICKA, J.. "FIA is Already a Routine Tool in Brazil". *Trends in Anal. Chem.* 1983, 2(7): V-VII.
63. REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; KRUG, F.J. e BERGAMIN Fº, H.. "Merging Zones in Flow Injection Analysis. Part 4. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Total Nitrogen and Phosphorus in Plant Material". *Anal. Chim. Acta.* 1980, 119: 305-311.

64. FERREIRA, M.; de ANDRADE, J.C. e BACCAN, N.. "Sistema Gravitacional de Alimentação de Líquidos com Vazão Constante para Uso em Análise por Injeção em Fluxo". *Química Nova*. 1986, 9(2): 123-128.
65. RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.. Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons, Inc., Londres, 1981.
66. de ANDRADE; ROCHA, J.C.; BACCAN, N. e PASQUINI, C.. "Effect of On-line Complex Formation Kinetics on the Flow Injection Analysis Signal: the Spectrophotometric Determination of Chromium (VI)". *Analyst*. 1983, 108: 621-625.
67. TOEI, K.; MOTOMIZU, S.; OSHIMA, M. e ONODA, M.. "Spectrophotometric Determination of Boron by Flow Injection Analysis". *Bunseki Kagaku*. 1986, 35(4): 344-348. *Anal. Abstr.*. 1986, 48(6): 996.
68. KRUG, F.J.; MORTATTI, J.; PESSENDA, L.C.R.; ZAGATTO, E.A.G. e BERGAMIN Fº, H.. "Flow Injection Spectrophotometric Determination of Boron in Plant Material with Azomethine-H". *Anal. Chim. Acta*. 1981, 125: 29-35.
69. LACHICA, M.. "Estudio sobre la Determination de Boro en Plantas con Azometina-H". 4<sup>th</sup> International Colloquium on the Control of Plant of Plant Nutrition. vol. II. A, Cottenie, Gent, 1976, p. 53-61.
70. BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R. e GALLO, J.R.. "Métodos de Análise Química de Plantas", Boletim Técnico do Instituto Agronômico de Campinas, 1983, 78: 29.
71. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. e MOSBAEK, H.. "Flow Injection Analysis. Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titrations".

- Anal. Chim. Acta.* 1977, 92: 235-249.
72. PASQUINI, C.. "Mechanical Removal of the Central Sample Zone to Avoid Air Bubbles in Monosegmented Continuous Flow Analysis". *Anal. Chem.*. 1986, 58: 2346-2348.
73. de ANDRADE, J.C. e LOBOSCHI, E.M.. "A Simple Digital Counter for Use with Monosegmented Continuous Flow Analysis and Related Techniques". *Analyst*, aceito.
74. ROCHA, J.C.. "Determinação Sequencial de Cr(III) e de Cr(VI) por Injeção em Fluxo Contínuo". Tese de Mestrado, Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 1983.
75. de ANDRADE, J.C.; ROCHA, J.C. e BACCAN, N.. "Sequential Spectrophotometric Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) Using Flow Injection Analysis". *Analyst*. 1985, 110(2): 197-199.
76. Reativos MERCK - Substancias Tampón, MERCK, Alemanha, p.13.
77. "Nomenclature, Symbols, Units and their Usage in Spectrochemical Analysis-II. Data Interpretation. *Spectrochim. Acta.* 1978, 33B: 242-245.
78. van MORTFORT, M.A.J. e HOUBA, V.J.G.. "A Statistical Contribution to the Plant Sample Exchange Programme: Marking Data", Plant Sample Exchange Programme, Wageningen Agricultural University, Holanda, 1986.
79. LAITINEN, H.A. e HARRIS, W.A.. Chemical Analysis, 2ª edição, McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., Tokyo, 1975.