

ROSELAINÉ CALZAVARA DA CUNHA

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO
DE BORO EMPREGANDO VOLTAMETRIA DE
PULSO DIFERENCIAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C972o
2010

Cunha, Roselaine Calzavara da, 1975-
Otimização da metodologia de determinação de boro
empregando voltametria de pulso diferencial / Roselaine
Calzavara da Cunha. – Viçosa, MG, 2010.
xiv, 63 f. : il. (algumas col.) ; 29 cm.

Orientador: Efraim Lázaro Reis.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 55-63.

1. Boro. 2. Voltametria. 3. Quimiometria. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. Ed. 546.671

ROSELAINE CALZAVARA DA CUNHA

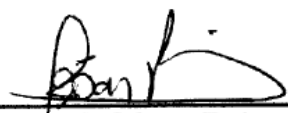
**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO
DE BORO EMPREGANDO VOLTAMETRIA DE
PULSO DIFERENCIAL**

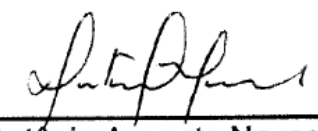
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

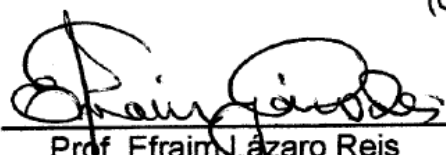
Aprovada: 09 de julho de 2010.


Prof. Reinaldo Francisco Teófilo


Prof. Paulo Henrique Fidêncio


Prof. César Reis
(Coorientador)


Prof. Antônio Augusto Neves
(Coorientador)


Prof. Efraim Lázaro Reis
(Orientador)

“O que distingue um mestre de um professor é a necessidade que tem o primeiro de doar e tornar o conhecimento indispensável, pois aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

“Só faremos melhor aquilo que repetidamente insistirmos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo e sim um hábito.”

Aristóteles

*Ao meu esposo Sávio, a pessoa
mais nobre que conheci e que em
todos os momentos foi minha
fortaleza, meu porto seguro e a
quem amo muito!*

Dedico

Agradecimentos

À Deus, que me fortalece e dá coragem para prosseguir na minha caminhada.

À minha mãe, Oraci, que mesmo distante fisicamente, estará sempre presente em meu coração.

Ao meu esposo, Sávio, por entender a minha ausência e me apoiar em todos os momentos da minha vida.

À minha família, pai, irmãos, cunhados e sobrinhas, e de maneira especial à Rosiane e Sabrine, que se preocuparam e sempre me incentivaram.

Ao orientador, Prof. Efraim Lázaro Reis, o meu sincero agradecimento por todas as contribuições à minha vida profissional, por acreditar no meu crescimento, por todo o apoio e pela grande amizade.

Ao Prof. César Reis, pelas sugestões, discussões e amizade.

Ao Prof. Antônio Augusto Neves, por sua preciosa ajuda, paciência, atenção e pela especial amizade.

Ao Prof. Reinaldo Francisco Teófilo, por todos os conselhos para execução deste trabalho, discussões, paciência e o pronto atendimento.

Ao Prof. Paulo Henrique Fidêncio, pela participação desta defesa.

À Prof^a. Maria Eliana Lopez Ribeiro de Queiroz, por todo o seu carinho e as palavras de consolo.

Ao Prof. Jorge Antônio Barros de Macêdo, um grande incentivador nesta jornada, o meu eterno agradecimento.

À Prof^a. Miriam e Souza de Almeida, minha querida professora, com quem aprendi a gostar da Química e minha inspiração. Agradeço por todos os incentivos e por sua confiança.

As minhas amigas, Renata e Elenice, por todos os consolos e palavras de conforto nos momentos mais oportunos.

As amigas, Julieta e Juliana Vanir, pelo conforto nas horas difíceis. Que saudade de vocês

Aos amigos do LINQ, Guilherme, Carlos Juliano, Priscylla, Ana Carolina, Juliana, Fernanda, Alex, Lívia, Fernando, Renato e Giovanna pela convivência e paciência.

Aos amigos do LAQUA, Simone, Ana Isabel, Flaviane, Fernanda, Elisa, Alessandra, Luis Manoel, Ricardo por todos os momentos de descontração e pela amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, e em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade na realização deste trabalho.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Lista de Abreviações	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. BORO.....	5
2.1.1. Boro em solo	6
2.1.2. Boro em vegetal.....	7
2.1.3. Boro em água.....	9
2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE BORO	10
2.2.1. Técnicas de extração de boro em solos	10
2.2.2. Técnicas de extração de boro em plantas.....	11
2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE BORO.....	11
2.4. O COMPLEXANTE VERMELHO DE ALIZARINA S.....	12
2.5. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	14
2.5.1. Voltametria Cíclica	15
2.5.2. Voltametria de Pulso Diferencial	15
2.5.3. Utilização de Técnicas Eletroquímicas na Determinação do Boro.....	16
2.6. QUIMIOMETRIA.....	17
2.6.1. Planejamentos Experimentais.....	17
2.6.2. Planejamento Exploratório de Plackett-Burman	18
2.6.3. Metodologia para Superfície de Resposta	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	21

3.1.1. Equipamento para Medidas Voltamétricas	21
3.1.2. Controle de pH	21
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	22
3.3. ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE BORO.....	22
3.4. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS	23
3.5. FIGURAS DE MÉRITO	25
3.5.1. Linearidade.....	25
3.5.2. Limites de Detecção e Quantificação.....	26
3.5.3. Repetitividade	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE BORO NA PRESENÇA DO VAS	28
4.2. EFEITOS DO pH NA OXIDAÇÃO DO COMPLEXO VAS-B	32
4.3. ESTUDOS PRELIMINARES	34
4.3.1. Tamanho da gota.....	34
4.3.2. Tempo de equilíbrio	35
4.3.3. Eletrólito de suporte.....	36
4.3.4. Concentração do VAS.....	37
4.4. EXPERIMENTO DE TRIAGEM	37
4.5. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	41
4.5.1. Validação da metodologia	49
4.5.1.1. Linearidade	49
4.5.1.2. Limites de detecção e quantificação	50
4.5.1.3. Repetitividade.....	50
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

Lista de Abreviações

B – boro

AAS – Espectrometria de absorção atômica

AES – Espectrometria de emissão atômica

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

ETAAS – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

HMDE – Eletrodo de mercúrio de gota pendente

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

ICP-MS – Espectrometria de massas com fonte de plasma

NAA – Análises de ativação neutrônica

OMS – Organização Mundial de Saúde

RSM – Metodologia de superfície de resposta

VAS – Vermelho de alizarina S

WHO – Organização Mundial de Saúde

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas da deficiência de boro nos vegetais: cenoura e couve-flor	8
Figura 2. Sintomas da toxicidade de boro em folhas de citrus, soja e café.....	9
Figura 3. Estrutura química do vermelho de alizarina S.....	13
Figura 4. Reação do VAS com ácido bórico	13
Figura 5. Representação esquemática da técnica de pulso diferencial.....	16
Figura 6. Célula voltamétrica com seus respectivos eletrodos.....	21
Figura 7. Voltamogramas cíclicos obtidos usando como eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,2) com velocidade de varredura 150 mV s^{-1} . (---) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ VAS; (—) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ VAS + $3,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ de boro.....	29
Figura 8. Possível reação de redução do VAS, segundo SOMMER & UMLAND (1980) ..	29
Figura 9. Dependência da raiz da velocidade de varredura no sinal da corrente na varredura anódica (A) e catódica (B).....	30
Figura 10. Comportamento voltamétrico do VAS e do complexo VAS-B na presença de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,2, velocidade de varredura $6,2 \text{ mV s}^{-1}$	31
Figura 11. Possível reação de oxidação do complexo VAS-B.....	32
Figura 12. Estrutura do VAS de acordo com a variação de pH.....	32
Figura 13. Voltamogramas obtidos do complexo VAS-B em função do pH do eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	33
Figura 14. Dependência do potencial do pico anódico em função do pH	34

Figura 15. Variação da resposta voltamétrica do complexo VAS–B em função do tamanho da gota na presença de VAS $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, velocidade de varredura $4,6 \text{ mV s}^{-1}$	35
Figura 16. Análise do tempo de equilíbrio no sinal voltamétrico do complexo VAS–B na presença de VAS $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Velocidade de varredura $4,6 \text{ mV s}^{-1}$	36
Figura 17. Voltamogramas obtidos através do planejamento Plackett-Burman (....) VAS e (—) VAS–B, seguindo a sequência da Tabela 4.....	39
Figura 18. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento Plackett-Burman	40
Figura 19. Parâmetros voltamétricos utilizados em voltametria pulso diferencial (Manual Software – METROHM).....	41
Figura 20. Planejamentos compostos centrais: $k = 3$ e $\alpha = \pm 1,682$ (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (○) ponto central (TEÓFILO & FERREIRA, 2006)	42
Figura 21. Voltamogramas obtidos através do planejamento composto central (....) VAS e (—) VAS–B, seguindo a sequência da Tabela 5	44
Figura 22. Distribuição dos resíduos: Gráfico (A) Respostas previstas pelo modelo vs Respostas observadas no experimento; Gráfico (B) Respostas previstas vs Resíduos.....	47
Figura 23. Superfície de resposta mostrando a resposta de corrente em função dos valores decodificados de velocidade de varredura e pH.....	47
Figura 24. Curvas de nível da resposta de corrente do complexo VAS–B.....	48
Figura 25. Curva analítica da corrente pico vs concentração de boro para avaliação da faixa de trabalho	50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett-Burman.....	24
Tabela 2. Matriz do planejamento Plackett-Burman utilizado para definir as variáveis que afetam significativamente a resposta voltamétrica	24
Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento composto central.....	25
Tabela 4. Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores codificados das variáveis independentes e respostas voltamétricas do complexo VAS-B.....	38
Tabela 5. Matriz do planejamento composto central com valores codificados e as respostas do sinal voltamétrico do complexo VAS-B.....	43
Tabela 6. Coeficientes e erros para o modelo da superfície de resposta	45
Tabela 7. Análise de variância do planejamento composto central.....	46
Tabela 8. Condições otimizadas da técnica de voltametria de pulso diferencial para análise de boro	48

Resumo

CUNHA, Roselaine Calzavara da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Otimização da metodologia de determinação de boro empregando voltametria de pulso diferencial.** Orientador: Efraim Lázaro Reis. Co-orientadores: Antônio Augusto Neves e César Reis.

O propósito deste trabalho foi otimizar, por meio de planejamentos experimentais, a técnica de voltametria de pulso diferencial empregando eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) na determinação de boro a nível de traço. Por ser eletroquimicamente inativo, o boro não pode ser determinado diretamente por técnicas voltamétricas. Entretanto, após a reação de complexação entre o ácido bórico e o vermelho de alizarina S (VAS), um pico voltamétrico anódico é obtido correspondente à oxidação do grupamento antraquinônico em $-0,473\text{ V}$ (vs Ag/AgCl) empregando o eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Fatores instrumentais e pH foram estudados utilizando o planejamento exploratório de Plackett-Burman para triagem dos fatores relevantes e, em seguida, para otimização dos níveis dos fatores um planejamento composto central (CCD) foi realizado. As melhores respostas voltamétricas foram obtidas, quando utilizados pH 7,2, tempo de pulso de 10 ms, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de $6,2\text{ mV s}^{-1}$. Os parâmetros potencial de acumulação, tempo de acumulação foram fixados em -800 mV s^{-1} e 0 s, respectivamente. Com os parâmetros otimizados, o sinal voltamétrico do complexo mostrou-se linearmente dependente da concentração de boro em uma faixa de 0,05 a $1,47\text{ mg L}^{-1}$ ($n = 10$). Os limites de detecção e de quantificação foram 9,72 e $32,4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O desvio padrão relativo (RSD) foi de 3,21% para 5 leituras independentes de uma solução padrão de boro de $40\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

Abstract

CUNHA, Roselaine Calzavara da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2010. **Optimization methodology for the determination of boron using differential pulse voltammetry.** Adviser: Efraim Lázaro Reis. Co-advisers: Antônio Augusto Neves and César Reis.

The purpose of this study was to optimize, by means of experimental design, the technique of differential pulse voltammetry using electrode mercury drop (HMDE) in the determination of boron at trace level. Because it is electrochemically inactive, boron cannot be determined by voltammetric techniques. However, after the complexation reaction of boric acid and alizarin red S (VAS), an anodic voltammetric peak is obtained corresponding to oxidation of the group of anthraquinone at -0.473 V (vs. Ag/AgCl) using the supporting electrolyte acetic acid / ammonium hydroxide 0.1 mol L^{-1} . Instrumental factors and pH were studied using the Plackett-Burman exploratory planning for screening of the relevant factors and then to analyze these factors a central composite design (CCD) was performed. The best voltammetric response was obtained when used pH 7.2, pulse time 10 ms, pulse amplitude of 50 mV and scan rate of 6.2 mV s^{-1} . The accumulation potential and accumulation time parameters were set at -800 mV s^{-1} and 0 s, respectively. With optimized parameters, the voltammetric signal of the complex was linearly dependent on the concentration of boron in the range $0.05 - 1.47\text{ mg L}^{-1}$ ($n = 10$). The detection and quantification limits were 9.72 and $32.4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The relative standard deviation (RSD) was 3.21% for five independent readings of a standard solution of boron of $40\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos procuram interagir desenvolvimento da ciência ao cotidiano das práticas na agricultura. Destes estudos resultaram no consumo de fertilizantes minerais que proporcionou elevados patamares de produção para abastecer o crescente aumento populacional.

Para atender as necessidades de culturas, em geral, os níveis de adubação é baseada em análises da fertilidade do solo. Esta fertilização quando feita de maneira aleatória pode comprometer a qualidade da safra e os gastos da produção. Fatores como excesso ou falta de nutrientes provocam desequilíbrios fisiológicos afetando a produtividade e comprometendo toda a produção. Para minimizar ou mesmo eliminar tal impacto é muito importante a realização das análises dos teores dos nutrientes disponíveis no vegetal, no solo, assim como na água. Entretanto, com a expansão da agricultura mundial, há necessidade de se obter dados mais precisos, que permitam ao mesmo tempo, melhorar a produtividade, a qualidade dos grãos e sementes, além da economia na adubação.

Dentre os nutrientes estão os micronutrientes, que mesmo exigidos em pequenas quantidades, são essenciais para o crescimento das plantas. Sua utilização tem sido cada vez mais difundida em várias regiões, com características distintas, no mundo inteiro.

Um destaque pode ser dado ao boro. Sua deficiência limitada em várias partes do mundo e frequentemente observada no Brasil. Assim, a análise deste micronutriente é de suma importância tanto em solos e vegetais, quanto em água, visto que a relação entre deficiência e toxicidade é muito pequena. O seu manejo quando efetuado de forma inadequada gera desequilíbrios fisiológicos na planta, alterando a absorção e promovendo deficiências de outros nutrientes.

Para minimizar estes efeitos, torna-se necessário a implementação de uma técnica rotineira com elevada sensibilidade e seletividade para quantificação deste elemento. O método mais empregado é a espectrofotometria por meio da reação colorimétrica entre o boro e a azomethina-H, mas os métodos colorimétricos sofrem várias interferências e possuem baixa sensibilidade e precisão (SAH & BROWN, 1997).

A análise de boro por métodos voltamétricos ainda é pouco explorada, portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar por meio de métodos estatísticos, a metodologia para determinação de boro empregando a voltametria de pulso diferencial utilizando o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). A utilização da voltametria para diversas finalidades tem se mostrado um método rápido, sensível, eficiente e de menor custo.

Por ser eletroquimicamente inativo, o boro não pode ser determinado por técnicas voltamétricas. Entretanto, através da reação entre o ácido bórico e o vermelho de alizarina S, o complexo formado pode se adsorver no eletrodo. Assim, para determinação da quantidade de boro, condições experimentais e parâmetros instrumentais foram otimizados por meio de planejamentos experimentais. Após a etapa de otimização, a eficiência do método foi analisada com a verificação da linearidade, dos limites de detecção e quantificação, bem como da repetitividade.

2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BORO

O boro é um elemento limítrofe com propriedades entre metal e ametal. O boro, após o carbono, apresenta uma química intrigante, complexa e única (BOLAÑOS *et al.*, 2004) não somente por suas propriedades químicas, mas também por suas funções biológicas (TANAKA & FUJIWARA, 2008). Por ser demasiadamente reativo o boro não ocorre livre na natureza e sim associado ao oxigênio. Sua principal origem é devido ao intemperismo da turmalina, onde são liberadas formas solúveis como ácido bórico e boratos, sendo também encontrado em outros minerais como bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), ulexita ($\text{CaNaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), colemanita ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e boracita ($\text{Mg}_3\text{B}_7\text{O}_{13}\text{Cl}$) (DAVIS *et al.*, 2002).

O boro e seus complexos apresentam propriedades química e física únicas e bastante variadas. O ácido bórico é um ácido de Lewis fraco com $\text{pK}_a = 9,2$. O boro em meio neutro e ácido apresenta-se na forma não-ionizada de ácido bórico (H_3BO_3) e, em altos valores de pH, encontra-se sob a forma de íon borato $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$. Para valores de pH que variam entre 7,0 a 11,5 estas formas estão em equilíbrio (DARBOURET & KANO, 2000; KAFTAN *et al.*, 2005) sendo dependentes das condições fisiológicas e da ausência de interações com biomoléculas (BROWN *et al.*, 2002).

O ácido bórico e seus sais são muito utilizados não só na manufatura de vidros, detergentes, retardante de chama, mas também como fertilizantes em solos. Além disso, o ácido bórico pode ser utilizado como desinfetante e na preservação de alimentos devido as suas propriedades fungicida e bactericida (CENGELÖGLÜ *et al.*, 2007; NIELSEN, 2008).

Evidências quanto a sua essencialidade vem aumentando tanto para humanos quanto para animais (OZCAN & YILMAZ, 2005), sendo considerado um mineral importante para nutrição humana por manter a função da membrana celular e reações enzimáticas. Combinando com outras substâncias tais como cálcio, magnésio e vitamina D, ajuda a prevenir osteoporose e artrite. Sua deficiência pode causar problemas nos ossos, inflamatórios e

hormonais, entretanto, em concentrações elevadas podem levar a distúrbios de apetite, atrofia e degeneração dos testículos. A toxicidade do boro e compostos não são muito evidentes, mas a assimilação destes pode resultar em efeitos tóxicos cumulativos na saúde humana. A dose diária recomendada é de 3 mg dia^{-1} , enquanto quantidades superiores a 500 mg dia^{-1} podem causar náusea, vômitos e diarreia (ECONOMOU *et al.*, 2004).

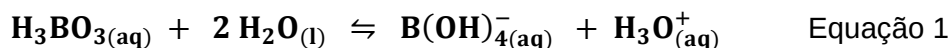
2.1.1. Boro em solo

Vários tipos de solo, em várias partes do mundo, sofrem com a deficiência de boro (SAH & BROWN, 1997). No Brasil, e em outras regiões do mundo como Japão, China e Estados Unidos, este é um micronutriente que os solos apresentam maior deficiência devido a sua facilidade de lixiviação, que está associada a sua grande mobilidade no solo (YNAMA & PRIMAVESI, 1973) e sua alta solubilidade (TANAKA & FUJIWARA, 2008).

O boro pode ser encontrado no solo de várias maneiras: solúvel em água, adsorvido, preso à matéria orgânica e fixado nos minerais de argila. Portanto, o teor total é o somatório destas formas. Segundo SUN e colaboradores (1998) apenas o boro solúvel em água é disponível aos vegetais. Assim, nas análises rotineiras não são avaliadas os teores totais, mas apenas o teor disponível no solo (MALAVOLTA, 2006).

Alguns fatores ambientais comprometem a disponibilidade de boro no solo para as plantas e são assim descritos, conforme GOLDBERG (1997): textura – ocorre menor capacidade de fixação de boro quanto mais arenoso for o solo; umidade – em época de seca diminui o teor de boro disponível e é a época em que os sintomas de deficiência são mais expressivos; matéria orgânica – com o aumento da matéria orgânica, há aumento do teor de boro disponível; pH – é o fator que tem maior influência na assimilação do boro pelas plantas. À medida que o pH aumenta ocorre uma diminuição na absorção.

Na maior parte dos solos os valores de pH são menores que 7, e o boro encontra-se na forma química estável do ácido bórico (H_3BO_3) não ionizada. Este composto é um ácido fraco ($K_h = 5,8 \times 10^{-10}$) e atua como ácido de Lewis, conforme descrito na equação:



O ácido bórico é pouco adsorvido no solo por possuir pouca afinidade pelos minerais de argila, tornando-se mais disponível para os vegetais. Com o aumento do pH, prevalece a forma ionizada do íon borato $[\text{B}(\text{OH})_4^-]$, que possui forte afinidade pelos minerais de argilas, resultando no aumento da adsorção do boro pelo solo (HU & BROWN, 1997).

A matéria orgânica exerce um efeito importante na disponibilidade de boro no solo. O mecanismo para fixação de boro é devido a sua complexação com a matéria orgânica. Quando a matéria orgânica é decomposta pelos microrganismos, esta libera boro para a solução do solo, onde parte é novamente absorvida pelas plantas, parte é perdida pela lixiviação e uma porção relativamente menor pode ser fixada pelos minerais de argilas (GUPTA, 1968; BERGER & PRATT, 1963).

KEREN & BINGHAM (1985) associam sua deficiência a restrição de diversas culturas de interesse. Na maioria dos solos a concentração de boro total varia entre 2 a 100 mg L⁻¹ definido por SWAINE (1955), porém BERGER (1949) mostra que a quantidade absorvida está em torno de 0,1 a 2 mg L⁻¹, e é obtida essencialmente de matéria orgânica. LINDSAY & COX (1985) definem que teores de boro em solo menores que 0,3 mg L⁻¹ apresentam deficiência e teores acima de 3,0 mg L⁻¹ apresentam toxicidade.

JACKSON (1964) admite que nos solos de regiões úmidas, o teor de boro total varia de acordo com a textura. Em solos argilosos, o teor de boro total varia de 30 a 60 mg L⁻¹, e em solos arenosos, de 2 a 6 mg L⁻¹. Nas regiões semi-áridas e áridas, esses teores podem ser superiores a 200 mg L⁻¹.

2.1.2. Boro em vegetal

A presença de boro em vegetais foi detectada em 1857 e sua essencialidade foi determinada, após pesquisas de WARINGTON (1923) e SOMMER & LIPMAN (1926), devido à necessidade deste para o completo ciclo de vida dos vegetais (ACUÑA, 2005; NIELSEN, 2008).

A função fisiológica desse micronutriente ainda não está bem definida, mas atribui-se ao boro muitos processos bioquímicos e fisiológicos da planta, tais como: formação da parede celular, síntese de lignina, transporte de

açúcares, estrutura da parede celular, metabolismo de carboidratos, metabolismos de RNA, metabolismo de ácido indolacético, metabolismo de compostos fenólicos, metabolismo de ascorbato, fixação de nitrogênio, respiração e diminuição da toxidez de alumínio (YAMADA, 2000).

A principal fonte de boro para os vegetais ocorre através de mineralização da matéria orgânica (MALAVOLTA, 2006). A absorção deste micronutriente pelos vegetais pode ocorrer pelas folhas ou ainda, principalmente, pelas raízes e é proporcional ao teor do boro na forma de ácido bórico não dissociado no solo (GOLDBERG, 1997).

Sua deficiência afeta o crescimento e limita a produtividade das culturas (ECONOMOU *et al.*, 2004; HE *et al.*, 2005). Devido à baixa mobilidade desse micronutriente os indícios de deficiência apresentam-se inicialmente nas folhas jovens podendo resultar em crescimento reduzido, perda de rendimento e até mesmo a morte da cultura. Estes problemas dependem do grau da deficiência, por fazer parte da estrutura da parede celular do vegetal (ASAD *et al.*, 2003), conforme demonstrado pela Figura 1. Os sinais dessa deficiência podem ser confundidos com os causados por insetos ou viroses. Por ser de difícil detecção em estágios iniciais, o diagnóstico só é possível quando a cultura já está bem danificada (SHORROCKS, 1985).

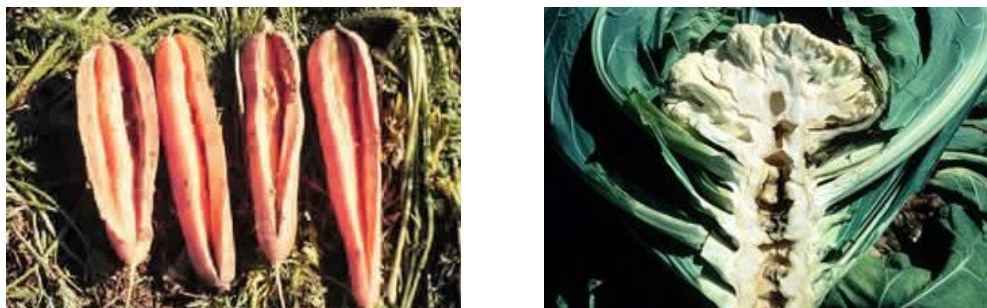


Figura 1. Sintomas da deficiência de boro nos vegetais: cenoura e couve-flor

A quantidade de boro necessária para cada espécie de vegetal é bastante peculiar, além disso, a relação entre os níveis de deficiência e excesso desse elemento é muito pequena (MALAVOLTA, 2006; VAN RAIJ *et al.*, 2001; GOLDBERG, 1997) quando comparado a outros micronutrientes. Portanto, faz-se necessário conhecer a distribuição dos micronutrientes em diferentes partes da planta para se detectar o problema com exatidão. MENGEL & KIRKBY (2001) determinam que os níveis de boro para a maioria

das espécies deve variar de 10 a 50 mg kg⁻¹. Quando em doses excessivas, o boro torna-se um herbicida (SIMSEK *et al.*, 2003) e o acúmulo em altas concentrações é considerado tóxico (ÇÖL & ÇÖL, 2003).

O excesso de boro é tóxico às plantas e animais. Seus sintomas levam desde a necrose de alguns órgãos até a morte da planta inteira dependendo da extensão e do grau de toxicidade, sendo perceptível, para a maioria das culturas, nas folhas mais velhas das plantas (GUPTA, 1993), como pode ser observado na Figura 2.



Figura 2. Sintomas da toxicidade de boro em folhas de citrus, soja e café

2.1.3. Boro em água

As variações das concentrações de boro e possível contaminação dos recursos hídricos podem ocorrer através de atividades antropogênicas devido à poluição por efluentes de esgotos, fertilizantes enriquecidos com boro, descarga de sabão e fabricação de detergente, como também por águas naturais por meio de interação rocha-água (OZCAN & YILMAZ, 2005; CENGELÖGLÜ *et al.*, 2008).

Segundo ACCIOLY & NEVES (1976), para o crescimento de plantas, pequenas quantidades são necessárias, porém, águas com concentrações de 1 a 2 mg L⁻¹ ou superiores têm efeito desfavorável sobre a vegetação. Quando encontrados elevados valores de concentrações de boro geralmente estão associados aos resíduos de agentes de limpeza e resíduos industriais.

A adsorção influencia significativamente no desempenho do boro em águas. Em águas com pH entre 7,5 e 9,0, há elevada adsorção de boro, assim como, em partículas sólidas, sobretudo argilas, óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e matéria orgânica (KEREN *et al.*, 1981).

De acordo com WHO (1998) a concentração de boro nas águas marinhas é de aproximadamente $4,5 \text{ mg L}^{-1}$, em águas superficiais pode variar de $0,001$ a 360 mg L^{-1} , nas águas subterrâneas de $0,3$ a 100 mg L^{-1} e nas águas de chuva variam de $0,02$ a $0,04 \text{ mg L}^{-1}$. A resolução do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 397 (BRASIL, 2005) considera limite o teor de boro total em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. As águas destinadas ao abastecimento humano ou agrícola apresentam concentrações que variam entre $0,1$ a 1 mg L^{-1} e conforme a OMS (Organização Mundial de Saúde) o valor máximo deve ser de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE BORO

2.2.1. Técnicas de extração de boro em solos

Para o fornecimento adequado de nutrientes aos vegetais é necessária a análise do solo. Para o boro, a avaliação é feita para determinar o teor de boro disponível para as culturas e não os teores totais, tornando o processo de extração difícil (CHAVES *et al.*, 2006). Portanto, as avaliações dos teores de nutrientes são de suma importância, tendo em vista que o nível de toxicidade para um vegetal pode ser alto enquanto para outro vegetal o nível pode ser deficiente (ABREU *et al.*, 2007). As soluções extratoras são testadas com a finalidade de simular com eficiência o que ocorre no solo.

Vários extratores como o Mehlich-1, o acetato de amônio, o manitol, o ácido acético, o NH_4HCO_3 -DTPA, o HCl, o CaCl_2 e a água quente são sugeridos para avaliação da fertilidade dos solos. O extrator mais empregado é o sugerido por BERGER & TRUOG (1939) com água quente através do aquecimento sob refluxo. Este processo, no entanto, exige vidraria isenta de boro, o procedimento é moroso inviabilizando a análise de muitas amostras ao longo do dia e, ainda, a dificuldade de controle no tempo de aquecimento e resfriamento da suspensão solo/solução (VAN RAIJ *et al.*, 2001).

Esta técnica vem sofrendo várias modificações com o intuito de aperfeiçoar as análises de rotina. ABREU *et al.* (1994) substituíram os frascos de vidro por saquinhos plástico, forno com radiação de microondas como fonte de aquecimento e solução extratora de cloreto de bário a $1,25 \text{ g L}^{-1}$ (CHAVES

et al., 2006). A substituição de cloreto de bário por cloreto de cálcio apresenta vantagens visto que os extratos obtidos são menos coloridos diminuindo o erro ao utilizar métodos espectrofotométricos para determinação de boro e, ainda, os filtrados dos extratos estão livres de material coloidal (CARTER & GREGORICH, 2008; REIS *et al.*, 2006).

2.2.2. Técnicas de extração de boro em plantas

A análise foliar é importante e auxilia no conhecimento da composição nutricional da cultura. A folha é a parte da planta que melhor representa o potencial produtivo da cultura.

Para análise dos nutrientes da amostra, esta deve ser solubilizada, ou seja, a matéria orgânica destruída e os nutrientes devem estar em solução. Esse processo pode ocorrer por via seca, através da incineração das amostras e dissolução das cinzas com ácido, à quente ou ainda, por via úmida, que emprega um ácido forte ou a combinação de ácidos à quente.

2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE BORO

Com a ampla utilização de compostos à base de boro em várias áreas de aplicação, tais como tecnologia, indústria e agricultura, a determinação de boro tornou-se importante devido a sua crescente inserção no ambiente (SARICA & ERTAS, 2001). A determinação de boro é uma das mais complexas entre os elementos químicos (RAMOS *et al.*, 2000) pela possível contaminação da amostra durante o seu pré-tratamento, sendo necessário o desenvolvimento e validação de métodos de fácil execução (SARKAR *et al.*, 2010). Devido a evolução da instrumentação, várias técnicas analíticas estão disponíveis e sendo aperfeiçoadas e estas utilizam desde métodos eletroquímicos a complexos métodos nucleares. Muitos destes são oriundos de métodos espectrofotométricos e fluorimétricos com a utilização de corantes orgânicos.

Em métodos espectrofotométricos são empregados azometina-H (DATTA *et al.*, 2002; MATSUO *et al.*, 2004), curcumina (LIU & LEE, 2009), quinalizarina, azul de metileno e cristal violeta (GARCÍA *et al.*, 1985) e

fluorimétricos - vermelho de alizarina S (CAMPAÑA *et al.*, 1992) e ácido cromotrópico (DARBOURET & KANO, 2000).

As técnicas de chama, espectrometria de absorção atômica (AAS) e espectrometria de emissão atômica (AES), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), análises de ativação neutrônica (NAA), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS), vem sendo utilizados na determinação de boro com algumas restrições já que a instrumentação é dispendiosa (CARRERO *et al.*, 2005).

Outra técnica interessante, mas ainda pouco difundida para análise de boro, é a voltamétrica. Esta técnica possui muitas vantagens operacionais como rapidez na análise, boa seletividade e sensibilidade, excelente precisão e exatidão, baixo custo de instrumentação e manutenção em comparação com outras técnicas de análise, e ainda, a possibilidade de análise simultânea de espécies (BELLIDO *et al.*, 2009).

2.4. O COMPLEXANTE VERMELHO DE ALIZARINA S

O 1,2-dihidroxiantraquinona-3-sulfonato de sódio, usualmente conhecido como vermelho de alizarina S (VAS) tem estrutura química apresentada na Figura 3. Pertence ao grupo dos corantes antraquinônicos e sua estrutura é bastante similar à própria antraquinona. O VAS é um ácido diprótico com valores de pK_{a1} (β -OH) = 5,39 e pK_{a2} (α -OH) = 10,72. A formação de complexos deste composto, com metais ou ácidos é possível devido ao grupamento hidroxila nas posições 1 e 2. Sua solubilidade é proveniente do grupamento sulfônico, não sendo componente reativo da molécula. O VAS é miscível em água e etanol, mas imiscível em alguns solventes orgânicos, principalmente éter.

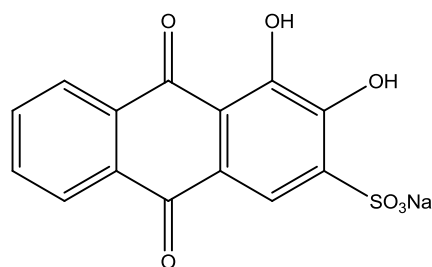


Figura 3. Estrutura química do vermelho de alizarina S

O VAS vem sendo amplamente empregado com propósitos analíticos para determinação de vários compostos orgânicos e inorgânicos. Este corante é seletivo para boro, sendo empregado pela primeira vez em 1936, para determinação de ácido bórico através de técnicas espectrofluorimétricas. Em estudos realizados por BROADBENT *et al.* (1977) foi verificado a formação de ésteres cíclicos envolvendo os grupos hidroxilas com ácido bórico com os derivados de antraquinonas. A possível reação com estequiometria 1:1 é representada pela Figura 4.

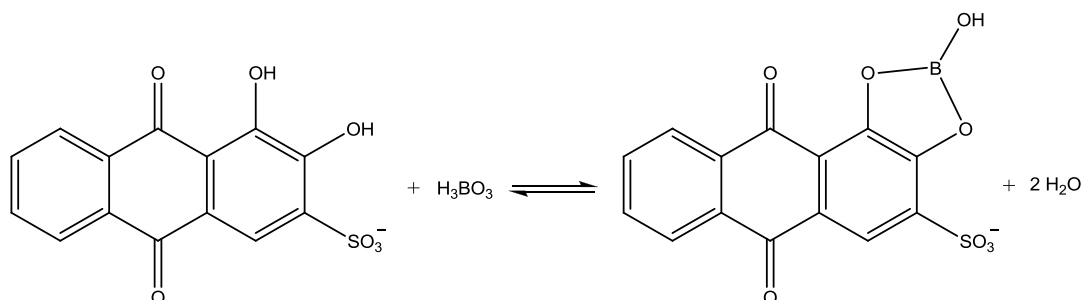


Figura 4. Reação do VAS com ácido bórico

Esta reação de complexação ocorre rapidamente e foi verificada pelos estudos realizados por CAMPAÑA *et al.* (1992) que a formação do complexo fluorescente entre VAS e boro foi desenvolvida imediatamente em tampão hidrogeno / dihidrogeno fosfato em pH 7,4. A técnica foi aplicada em matrizes de solos, vegetais e águas com limite de detecção de $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Vários agentes complexantes e de várias classes vem sendo empregados para determinação de vários elementos de quase todos os grupos da classificação periódica. Mas o grupo das alizarinas tem sido empregado com grande destaque em técnicas voltamétricas (ALGHAMDI, 2010). Há uma variedade de trabalhos envolvendo métodos voltamétricos onde os complexos

formados com o VAS são utilizados para quantificação de cobre (SHIU & CHAN, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2008), escândio (ZHANG *et al.*, 2001), zircônio (ZITTEL & FLORENCE, 1967; HENG LI *et al.*, 2007; HONG DENG *et al.*, 2008), vanádio (HENG LI *et al.*, 2008), gálio (HENG LI *et al.*, 2005) entre outros metais, mas também, para quantificação de proteínas (SUN & JIAO, 2002).

2.5. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

A voltametria é uma técnica eletroquímica baseada na medida de intensidade da corrente após a aplicação de uma diferença de potencial variável, induzindo a uma reação de oxidação-redução de acordo com o analito. A resposta obtida é característica ao analito em questão e é controlada pelo potencial aplicado. A curva obtida, corrente vs potencial, é denominada de voltamograma e possibilita a obtenção de dados quantitativos e qualitativos das espécies envolvidas na reação.

Assim, esta técnica é uma alternativa viável na identificação e determinação de traços e ultratraços de espécies eletroativas de compostos orgânicos, organometálicos e inorgânicos. Muitas espécies são frequentemente determinadas sendo inicialmente preconcentradas na superfície do eletrodo, seguida pela redissolução da espécie acumulada. Esta técnica também é interessante para compostos eletroquimicamente inativos os quais podem ser determinados através da adição de agente complexante, que se complexa ao analito de interesse e é acumulado na superfície do eletrodo podendo assim, ser determinado (BUFFLE & WAEBER, 2005), se o complexo for eletroativo.

Uma característica interessante desta técnica é a possibilidade da análise de uma espécie diretamente na matriz quando a reação eletroquímica é particularmente seletiva na presença de interferentes potenciais (ZUMAN, 2000).

Com o crescimento da demanda para análise de substâncias de várias áreas, a nível traço, as técnicas voltamétricas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas com intuito de melhorar a sensibilidade (WANG, 1985).

2.5.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica consiste na variação do potencial no sentido anódico/catódico até um determinado valor e, em seguida, o potencial é invertido no sentido catódico - anódico, ao seu valor de potencial inicialmente aplicado. Através dos voltamogramas cíclicos são obtidos vários parâmetros importantes tais como correntes de pico e potenciais de picos que podem ser usados para análises de reações reversíveis, quase-reversíveis ou ainda irreversíveis. Estes voltamogramas também auxiliam na escolha da variação de potencial para oxidação ou redução do analito.

É um método eletroanalítico muito empregado para estudos das espécies eletroativas e é muitas vezes um experimento preliminar a ser realizado para avaliação da reação eletroquímica na superfície do eletrodo (RAMESHAM & ROSE, 1997) e tornou-se muito conhecida para estudos eletroquímicos de novos sistemas (BARD & FAULKNER, 2001). Esta técnica é a mais utilizada para obter informações qualitativas sobre as reações eletroquímicas. A análise das respostas de corrente fornece subsídios sobre os processos termodinâmicos de oxirredução, da cinética das reações e, ainda, com os processos adsorptivos e as reações químicas vinculadas (WANG, 2000). Entretanto, não é sensível para quantificação, mas é muito utilizada para otimização das condições analíticas (BUFFLE & WAEBER, 2005).

2.5.2. Voltametria de Pulso Diferencial

Um problema associado aos dados eletroanalíticos é a presença de corrente capacitiva. E para diminuição desta contribuição foram desenvolvidas técnicas baseadas na aplicação de pulsos de potencial (ESTEBAN *et al.*, 2006), os quais oferecem uma alta sensibilidade e alta discriminação entre a corrente faradáica e a corrente capacitiva (COPELAND *et al.*, 1973). A diferença de potencial é medida antes (I_1) e no final da aplicação do pulso (I_2). Este procedimento é realizado uma vez que a corrente capacitiva decai mais rapidamente que a corrente faradáica, portanto, a corrente medida no final do pulso é praticamente faradáica (BARD & ZOSKI, 2000), como pode ser observado pela Figura 5.

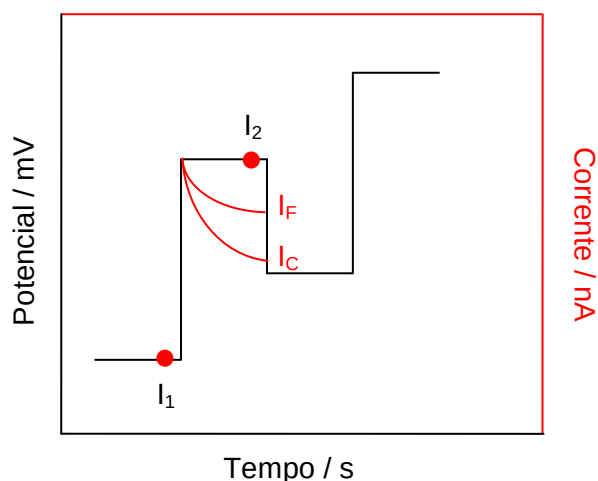


Figura 5. Representação esquemática da técnica de pulso diferencial

2.5.3. Utilização de Técnicas Eletroquímicas na Determinação do Boro

Pelo fato do boro ser uma espécie eletroinativa, os métodos voltamétricos não são adequados para sua determinação (TANAKA *et al.*, 2006) sendo necessários agentes complexantes associados a técnicas de adsorção e redissolução.

THUNUS (1996) analisou boro empregando voltametria adsortiva por redissolução, no modo pulso diferencial através do HMDE. Em plasma sanguíneo utilizando o beryllon(III) como agente complexante. Mas para formação do complexo boro-beryllon(III) foi necessária a etapa de aquecimento para acelerar a formação deste complexo.

TANAKA *et al.* (2006) também utilizou o mesmo agente complexante, beryllon(III), para determinação de boro em matrizes de ferro e aço por voltametria adsortiva de redissolução catódica, no modo pulso diferencial empregando o HMDE, com limite de detecção de 1 mg kg^{-1} .

SAHIN & NAKIBOGLU (2006) em análise de água utilizaram vermelho de alizarina S para análise direta de boro aplicando a técnica pulso diferencial com HMDE. O método mostrou-se compatível com aquele que emprega azometina-H e apresentou um limite de detecção estimado de $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

2.6. QUIMIOMETRIA

A evolução da tecnologia nos últimos anos influenciou significativamente o interfaceamento de computadores aos instrumentos de medição. Com o grande volume de informações geradas nas análises químicas surgiu a quimiometria, que vem como alternativa para análise de dados multivariados, qualitativo e quantitativo, produzidos simultaneamente de forma eficiente e criteriosa (NI & KOKOT, 2008). Estes dados são obtidos através de poucos experimentos e, conseqüentemente, um menor consumo de reagentes e trabalho laboratorial são necessários.

A utilização de quimiometria em dados eletroquímicos ainda tem sido rara se comparada à espectroscopia. Sua aplicação pode ser feita em diferentes etapas do processo analítico como, por exemplo, planejamento experimental e otimização. Através da otimização de parâmetros experimentais, e ainda instrumentais, é possível obter resultados ainda mais satisfatórios (ESTEBAN *et al.*, 2006) e estudos minuciosos por meio de superfície de resposta (FURNALETTO *et al.*, 2000).

2.6.1. Planejamentos Experimentais

Por meio de métodos quimiométricos é possível estudar vários fatores simultaneamente e desenvolver modelos matemáticos que permitam a avaliação da relação e significância estatística, não só de fatores que estão sendo analisados, mas também de suas interações (TARLEY *et al.*, 2009).

Estatisticamente um planejamento experimental multifatorial é muito eficiente, pois são obtidas várias informações com menor esforço do que na clássica análise univariada (FURNALETTO *et al.*, 2000) e este processo demanda principalmente tempo e gasto de reagentes. Através da otimização das condições operacionais é realizado um número menor de experimentos (BRASIL, 2007).

No planejamento experimental é possível determinar quais fatores têm efeitos relevantes no sinal analítico e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. O planejamento fatorial permite também, medir as interações entre diferentes fatores. Essas interações constituem

componente principal de muitos métodos de otimização. Sem o uso de planejamentos experimentais, importantes interações de fatores não são detectadas e a otimização pode levar mais tempo para ser alcançada.

2.6.2. Planejamento Exploratório de Plackett-Burman

O planejamento do tipo Plackett-Burman permite uma avaliação prévia de um grande número de variáveis simultaneamente, “*Screening Design*” e tem sido utilizado no desenvolvimento e validação de métodos (LI *et al.*, 2005). Através deste planejamento é feita a seleção das variáveis que afetam significativamente a resposta analítica eliminando os efeitos de interação entre estes (SANZ *et al.*, 1999).

A utilização deste planejamento é muito eficiente para que sejam realizados poucos experimentos, mesmo havendo um grande número de variáveis e obter informações válidas estatisticamente (KAVALCI *et al.*, 2008). Através deste método é possível selecionar os fatores que influenciam significativamente o processo e não para otimizar o processo propriamente dito. Neste planejamento, os efeitos principais de $n-1$ níveis são avaliados por n experimentos.

Por meio de uma triagem preliminar obtém-se um conhecimento maior sobre o sistema permitindo sua exploração mais detalhada (FURNALETTO *et al.*, 2000).

2.6.3. Metodologia para Superfície de Resposta

Em uma análise é necessário determinar os valores dos parâmetros experimentais em que a resposta atinge o seu valor ótimo. Este valor ótimo pode ser máximo ou mínimo em função dos parâmetros. Uma das metodologias empregadas para obtenção destes valores é a Metodologia de Superfície de Resposta (Response Surface Methodology - RSM) (KALAVATHY *et al.*, 2009).

A RSM é um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos que são bastante utilizados para modelamento e análise de problemas. Esta metodologia envolve a utilização de experimentos com medidas adequadas e confiáveis da resposta de interesse, a obtenção de um modelo matemático

adequado e ainda os efeitos das variáveis e suas interações sobre os parâmetros (ASLAN, 2008).

Os planejamentos fatoriais completos, além de fracionário e outras formas mais complexas como o composto central entre outros, são muito utilizados para obtenção de superfície de resposta. Estes planejamentos podem ser utilizados não apenas para obtenção da superfície de resposta, mas também torna possível a determinação dos fatores experimentais que são os mais importantes na investigação e que afetam os resultados (FERREIRA *et al.*, 2007).

3

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1. Equipamento para Medidas Voltamétricas

O analisador voltamétrico modelo 797 VA Computrace da Metrohm foi utilizado para executar este trabalho. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de mercúrio no modo eletrodo de mercúrio de gota pendente (*hanging mercury drop electrode* – HMDE), o eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) e um fio de platina como eletrodo auxiliar, conforme apresentado na Figura 6. O potenciostato é interfaceado a um microcomputador via USB e o sistema é gerenciado pelo software 797 VA Computrace, versão 1.2. Os dados foram processados através dos programas Origin Pro 7.5 e Statistica 7.0.

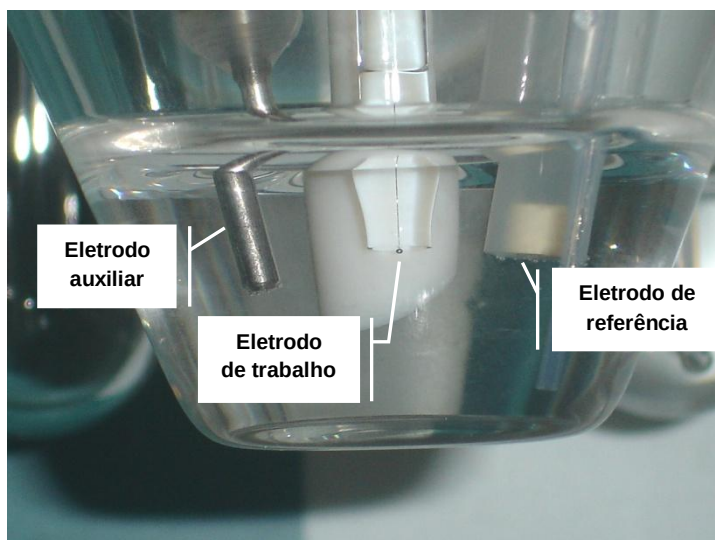


Figura 6. Célula voltamétrica com seus respectivos eletrodos

3.1.2. Controle de pH

Para a medida do pH das soluções foi utilizado um pHmetro Orion-Jundilab, modelo 720 A com eletrodo de vidro, combinado com eletrodo de referência de Ag/AgCl.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água utilizada para o preparo das soluções foi destilada e posteriormente deionizada. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno.

As vidrarias e frascos de polietileno foram lavados e, em seguida imersos em solução de HNO_3 (Quimex) 10% (v/v) por 24 horas e enxaguados com água deionizada em abundância.

O mercúrio empregado como eletrodo de trabalho foi purificado, sendo previamente filtrado e em seguida lavado por no mínimo três vezes com HNO_3 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e finalmente filtrado em papel de filtro.

Solução estoque de boro 1000 mg L^{-1} : A solução estoque foi preparada pela dissolução de 5,7182 g de H_3BO_3 (Merck) em água, e o volume completado para 1000 mL em balão volumétrico. As soluções padrão em concentrações de 4 a 700 mg L^{-1} foram obtidas por diluições sucessivas da solução estoque em água.

Solução estoque de vermelho de alizarina $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: A solução estoque foi preparada pela dissolução de 1,8024 g de vermelho de alizarina S (Vetec) em água e o volume completado para 500 mL em balão volumétrico. A solução de trabalho na concentração de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida por diluição apropriada da solução estoque em água.

Solução de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$: A solução estoque foi preparada pela diluição de 18,6128 g do sal dissódico do EDTA (Vetec) em água e o volume completado para 500 mL em balão volumétrico.

Solução de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ / hidróxido de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$: Esta solução foi utilizada como eletrólito de suporte sendo preparada pela mistura da solução de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec) e hidróxido de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec).

3.3. ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE BORO

O procedimento padrão para determinação do complexo VAS-B consistiu na adição de 1,00 mL de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 5,00 mL do eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e 4,00 mL de água. O

pH da solução foi ajustado em 7,2 com hidróxido de amônio 1 mol L⁻¹. A solução foi então transferida para a célula voltamétrica, agitada e o oxigênio dissolvido foi removido mediante a passagem de nitrogênio ultrapuro por 300 s. Nas sucessivas adições da amostra ou padrão, mantendo o tempo de purga de 60 s. Iniciou-se a varredura no modo anódico de -700 a -300 mV após um tempo de equilíbrio de 5 s, obtendo-se o voltamograma do eletrólito de suporte (ensaio em branco). Após a adição de 100 µL de VAS 10⁻⁴ mol L⁻¹ um novo voltamograma foi adquirido. E por último para obtenção do voltamograma do complexo VAS–B foi adicionado 100 µL de B 100 mg L⁻¹. Para cada adição foi realizada quatro varreduras e a média destas foi utilizada para otimização das condições experimentais a serem seguidas por todo o estudo.

As medidas voltamétricas foram realizadas por varredura pulso diferencial para obtenção da melhor resposta. A resposta voltamétrica (R_v) foi obtida utilizando a Equação 2.

$$R_v = \frac{i_p}{l_p} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo i_p a corrente de pico em ampere (A) e l_p a largura do pico à meia altura em milivolts (mV).

3.4. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

Com a finalidade de definir quais variáveis afetam significativamente a resposta voltamétrica foi realizado em uma primeira etapa um planejamento saturado de triagem do tipo Plackett-Burman. Sete variáveis foram avaliadas com doze ensaios. Quatro repetições no ponto central foram incluídos para avaliação do erro experimental. Alguns fatores e níveis investigados foram baseados em estudos prévios realizados por SAHIN & NAKIBOGLU (2006). O software Statistica 7.0 foi utilizado para gerar o planejamento experimental e executar a análise dos resultados.

As variáveis independentes estudadas foram: pH, potencial de acumulação (PA), tempo de acumulação (TA), amplitude do pulso (AP), tempo de pulso (TP), incremento de voltagem (IV) e incremento de tempo (IT). Na

Tabela 1 são mostrados os níveis selecionados para estudo de cada variável independente no planejamento Plackett-Burman.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett-Burman

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	6,0	7,0	8,0
Potencial de acumulação (mV) (PA)	- 800	- 700	- 600
Tempo de acumulação (s) (TA)	0	5	10
Tempo de pulso (ms) (TP)	10	20	30
Amplitude do pulso (mV) (AP)	40	50	60
Incremento de voltagem (mV) (IV)	0,458	1,755	3,052
Incremento de tempo (s) (IT)	0,2	0,3	0,4

Na Tabela 2 são mostradas as variáveis codificadas do planejamento na ordem em que foram executadas.

Tabela 2. Matriz do planejamento Plackett-Burman utilizado para definir as variáveis que afetam significativamente a resposta voltamétrica

Experimento*	Variáveis						
	pH	PA	TA	AP	TP	IV	IT
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
9	0	0	0	0	0	0	0
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
12	0	0	0	0	0	0	0
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
11	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1

* ordem de execução do experimento

Posteriormente à análise dos resultados do planejamento Plackett-Burman, realizou-se o planejamento composto central com 5 pontos centrais. Na Tabela 3 é apresentada a faixa de valores avaliados no planejamento composto central.

Tabela 3. Variáveis e níveis avaliados no planejamento composto central

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	5,5	6,2	7,2	8,2	8,9
Amplitude do pulso (mV)	41,6	45	50	55	58,4
Velocidade (mV s ⁻¹)	3,8	6,2	9,2	12,2	14,5

A análise de variância (ANOVA) foi empregada com o objetivo de comparar as variáveis avaliadas e investigar a existência de diferenças significativas entre estas, dentro da região experimental estudada.

3.5. FIGURAS DE MÉRITO

Uma figura de mérito é um parâmetro de avaliação do desempenho e eficiência de um método, desenvolvido ou aperfeiçoado, em função dos resultados obtidos. Tendo em vista que estes resultados possam ser utilizados de maneira confiável. As figuras de mérito avaliadas para validação da técnica eletroquímica utilizada para determinação de boro foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e repetitividade.

3.5.1. Linearidade

Dentro de um intervalo de concentração, verificou-se a linearidade das respostas do método por voltametria de pulso diferencial otimizado em relação a concentração do boro.

A partir dos parâmetros otimizados, o teste foi realizado de maneira aleatória e independentemente. Após as leituras do branco e do VAS, foi adicionado 100 µL de solução de trabalho de boro em uma faixa de

concentração entre 1 e 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtenção da corrente no potencial referente ao complexo VAS–B em cada medida.

3.5.2. Limites de Detecção e Quantificação

Limite de detecção (LD) é a quantidade mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais adotadas (BRITO *et al.*, 2003).

Limite de quantificação (LQ) é a quantidade mínima do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (BRITO *et al.*, 2003).

Com os parâmetros otimizados foi efetuada a varredura do branco seguida pela varredura do agente complexante VAS. O valor da corrente no potencial de meia onda referente ao complexo VAS–B foi então obtido. Este procedimento foi realizado sete vezes de maneira independente. Pelas repetições, o desvio padrão foi calculado e os valores dos limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$LD = 3 \times \frac{s}{b} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad \text{Equação 4}$$

sendo “s” o desvio padrão das leituras do branco e “b” é a inclinação da curva analítica.

3.5.3. Repetitividade

Pela repetitividade de um método é possível analisar a precisão deste. A avaliação da dispersão dos resultados entre sete medidas independentes foram realizadas na amostra de água deionizada fortificada com 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de boro em um mesmo dia.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DE BORO NA PRESENÇA DO VAS

Estudos preliminares usando por voltametria cíclica foram realizados com o intuito de investigar o comportamento eletroquímico do ligante livre VAS e do complexo VAS–B no eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE).

Na Figura 7 estão representados os voltamogramas cíclicos, na faixa de potencial de -0,7 a -0,3 V no eletrodo de mercúrio, sem tempo de acumulação, com velocidade de varredura de 150 mV s^{-1} . Estes voltamogramas elucidam o comportamento voltamétrico do VAS na presença e na ausência de boro. Observa-se que durante a varredura anódica o sinal de oxidação do ligante livre (Pa_1) ocorre em -0,534 V e um pico correspondente à sua redução (Pc_1) aparece em -0,539 V. Após a adição de $3,92 \text{ mg L}^{-1}$ de boro, verifica-se uma diminuição do pico Pa_1 e o surgimento de um novo pico anódico (Pa_2) no potencial -0,473 V, enquanto um correspondente pico catódico (Pc_2) com menor sinal em -0,478 V. Isto infere que o processo de oxirredução é quase reversível em virtude da altura do pico anódico ser inferior ao pico catódico. Estes resultados indicam que há interação entre o boro e o ligante VAS. Com adições sucessivas de boro ocorre um aumento tanto do pico Pa_2 quanto do pico Pc_2 . O pico Pa_2 foi utilizado para análise quantitativa de boro por apresentar maior sensibilidade que o pico Pc_2 .

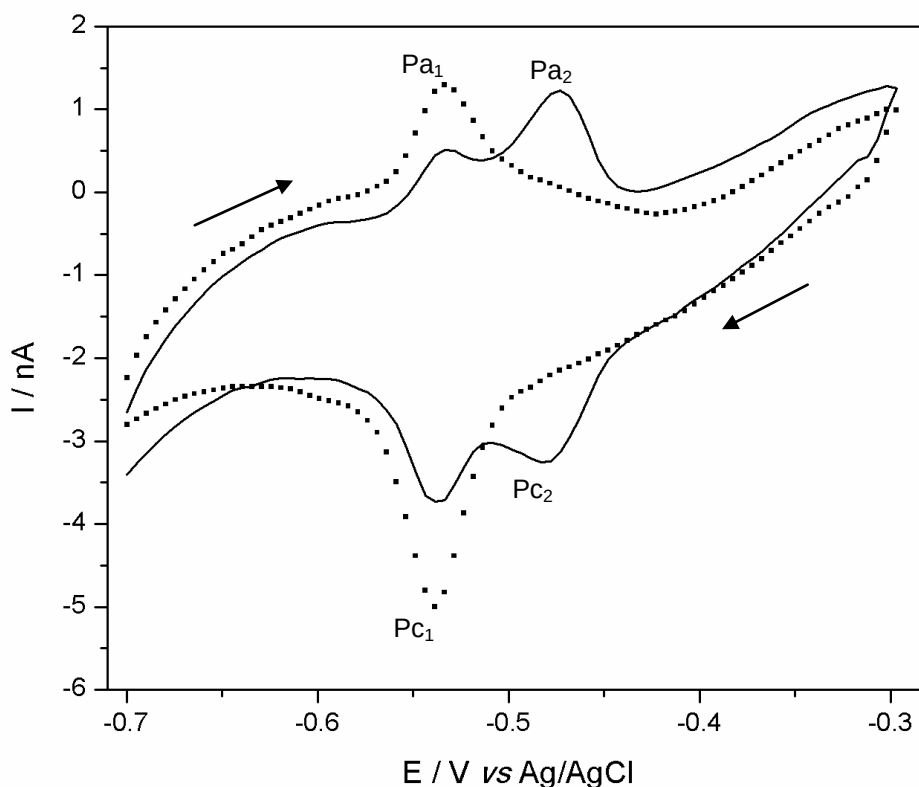


Figura 7. Voltamogramas cíclicos obtidos usando como eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,2) com velocidade de varredura 150 mV s^{-1} . (•••) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ VAS; (—) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ VAS + $3,92 \text{ mg L}^{-1}$ de boro

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por HENG LI *et al.* (2005) que estudaram um procedimento para quantificação de gálio, por meio de sua complexação com o VAS, empregando a técnica voltamétrica adsortiva de redissolução com o eletrodo de pasta de carbono. Neste estudo verificou-se que a redução do ligante livre é proveniente da redução do grupamento antraquinonila a dihidroantraquinonila, como representado na Figura 8 com base no estudo realizado por SOMMER & UMLAND (1980).

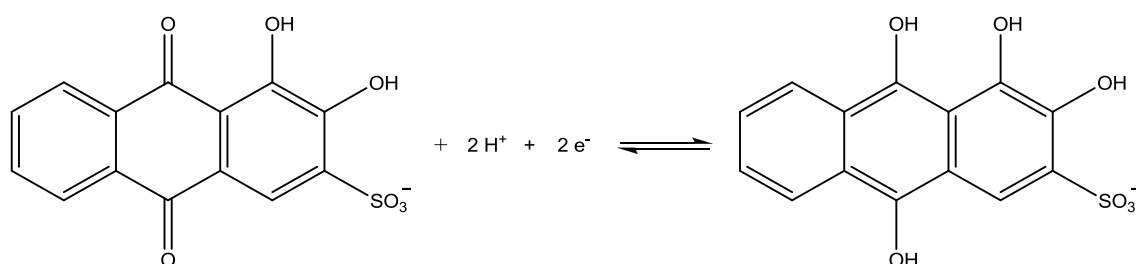


Figura 8. Possível reação de redução do VAS, segundo SOMMER & UMLAND (1980)

O comportamento adsortivo do complexo VAS–B foi investigado pelos voltamogramas cíclicos repetitivos na mesma gota de mercúrio utilizando 100 μL de VAS $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e boro $3,92 \text{ mg L}^{-1}$ em uma faixa de potencial de $-0,7$ a $-0,3 \text{ V}$ em diferentes velocidades de varredura. Observou-se neste experimento um aumento gradativo das correntes de pico em função do número de ciclos. Este comportamento eletroquímico do complexo VAS–B é proveniente de um processo adsortivo.

A oxidação do complexo VAS–B, no HMDE, é bastante rápida com velocidades suficientemente altas, o qual é confirmado pela relação linear entre a corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (Figura 9), esperado para um processo controlado por transporte de massa difusional.

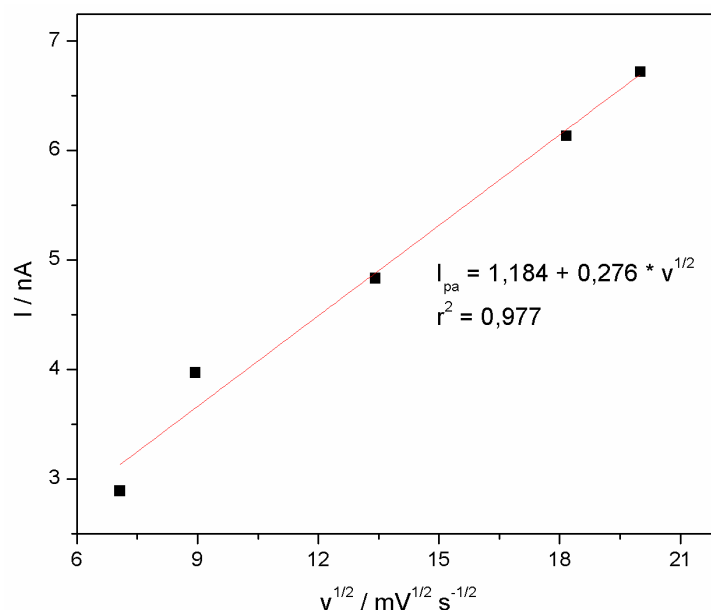


Figura 9. Dependência da raiz quadrada da velocidade de varredura no sinal da corrente na varredura anódica

Para a determinação de boro, as técnicas voltamétricas podem ser utilizadas, com facilidade, após sua complexação com espécies eletroativas. Este método é baseado nos diferentes potenciais redox para redução e/ou oxidação do complexo ou do ligante livre. Como pode ser verificado na Figura 10, somente um pico (P_1) aparece no voltamograma de pulso diferencial de VAS em potencial de $-0,56 \text{ V}$. Quando uma microquantidade de boro é adicionada à solução na célula voltamétrica, um novo pico (P_2), referente ao complexo, aparece em potenciais menos negativos ($-0,49 \text{ V}$) que o potencial de

meia onda do ligante livre. Observa-se que há uma diminuição do sinal voltamétrico referente ao pico P_1 acompanhado pelo aumento do sinal voltamétrico do pico P_2 com incrementos de microquantidades de boro à solução. Isto indica que o aumento da corrente de pico P_2 é causado pela oxidação do complexo VAS–B. Sendo a corrente de pico anódica, obtida em -0,49 V, proporcional a concentração de boro em solução, o pico do complexo pode ser empregado para determinação de boro em amostras ambientais.

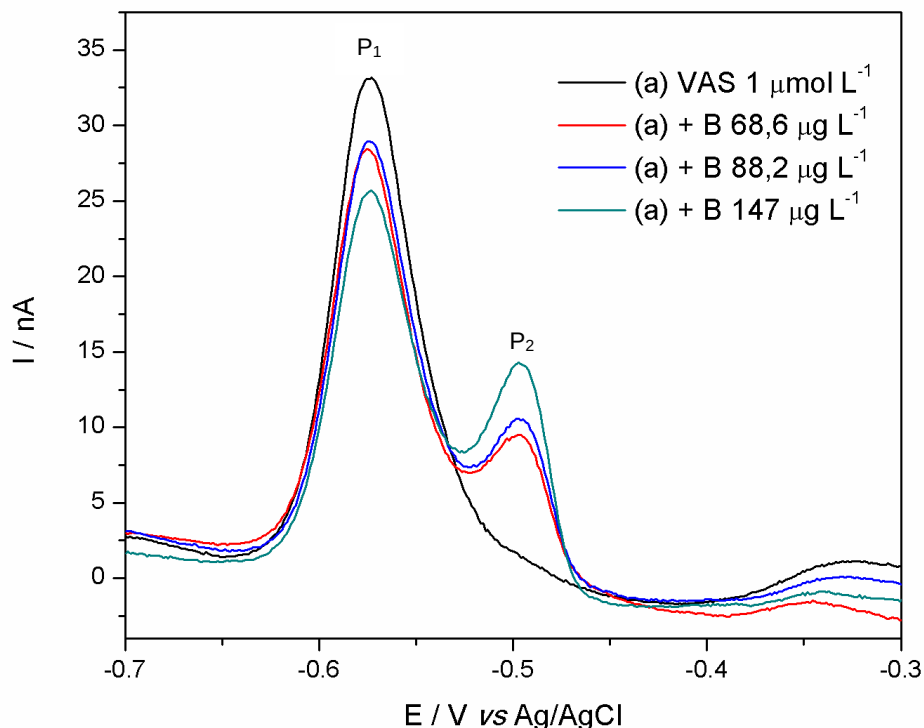


Figura 10. Comportamento voltamétrico do VAS e do complexo VAS–B na presença de suporte ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,2, velocidade de varredura $6,2 \text{ mV s}^{-1}$.

Sendo assim é possível inferir que a reação do complexo VAS–B que ocorre na superfície do eletrodo, em potenciais menos negativos, pode ser demonstrada pela Figura 11.

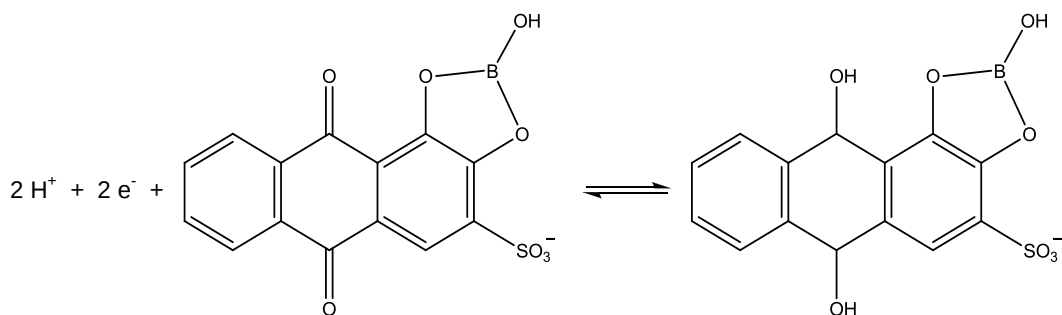


Figura 11. Possível reação de oxidação do complexo VAS-B

4.2. EFEITOS DO pH NA OXIDAÇÃO DO COMPLEXO VAS-B

Como representada pela equação das Figuras 8 e 11 a oxidação do VAS é dependente do pH. O VAS, de $pK_{a1} = 5,39$ e $pK_{a2} = 10,72$, pode, em solução aquosa, apresentar diferentes formas como mostra a Figura 12.

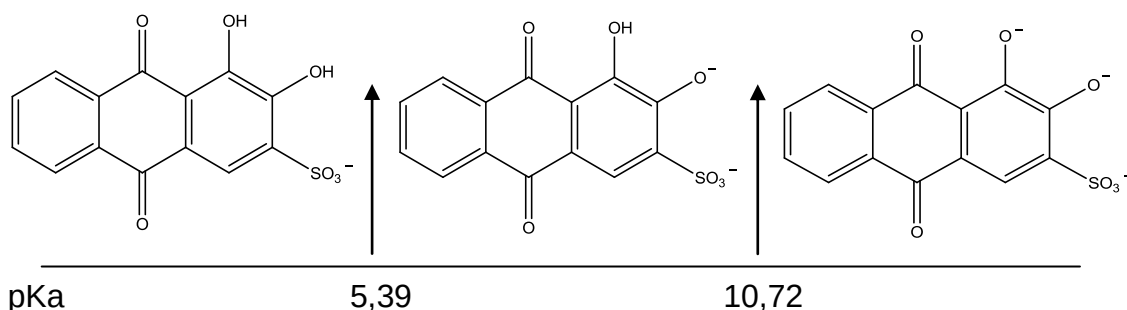


Figura 12. Estrutura do VAS de acordo com a variação de pH

Em meio ácido, tanto o VAS quanto o H_3BO_3 , estão protonados e a reação de complexação não é satisfatória. Em meio suficientemente alcalino, ambos estão desprotonados e ocorre uma repulsão eletrostática. Enquanto em uma região intermediária a reação é favorecida pela desprotonação do grupamento β -hidroxil, mas não pela desprotonação do ácido bórico.

Como pode ser observado na Figura 13, há um deslocamento dos valores de potenciais frente a variação do pH da solução. Isto indica que os íons hidrogênios fazem parte da reação de eletrooxidação. Nas análises preliminares verificou-se que tanto os potenciais de pico do ligante livre quanto do complexo deslocaram para potenciais mais negativos com o aumento do pH, evidenciando esta dependência.

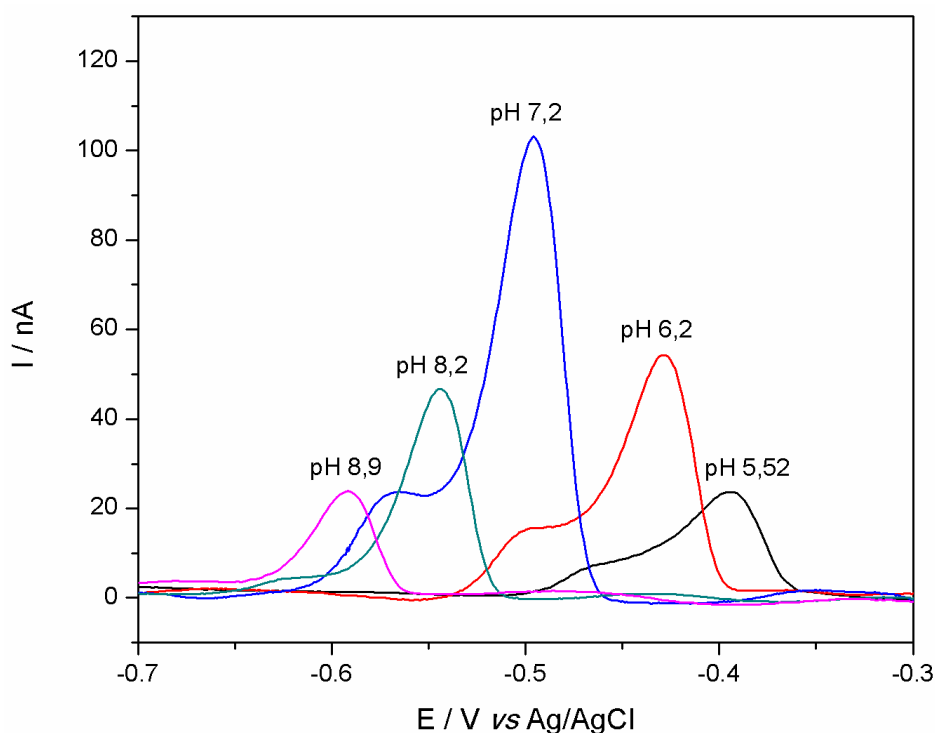


Figura 13. Voltamogramas obtidos do complexo VAS–B em função do pH do eletrólito de suporte ácido acético / hidróxido de amônio 0,1 mol L⁻¹

A Figura 14 ilustra a dependência do potencial de pico anódico na variação de pH. Observa-se nesta figura a relação linear entre deslocamento para potenciais catódicos do complexo VAS–B em função do aumento de pH, demonstrando um aumento da capacidade de oxidação do complexo. Este comportamento é Nernstiano e foi confirmado utilizando-se o coeficiente angular da relação linear entre o potencial de pico e o pH de -59 mV pH^{-1} , esperado teoricamente para a reação eletroquímica, envolvendo uma razão unitária entre prótons e elétrons, assegurando a reação. Isto também pode ser verificado pela Figura 11, segundo o princípio de Le Chatelier, com a diminuição da acidez há um deslocamento do equilíbrio para a oxidação do complexo VAS–B, ou seja, a oxidação fica mais facilitada, ocorrendo em valores maiores de pH.

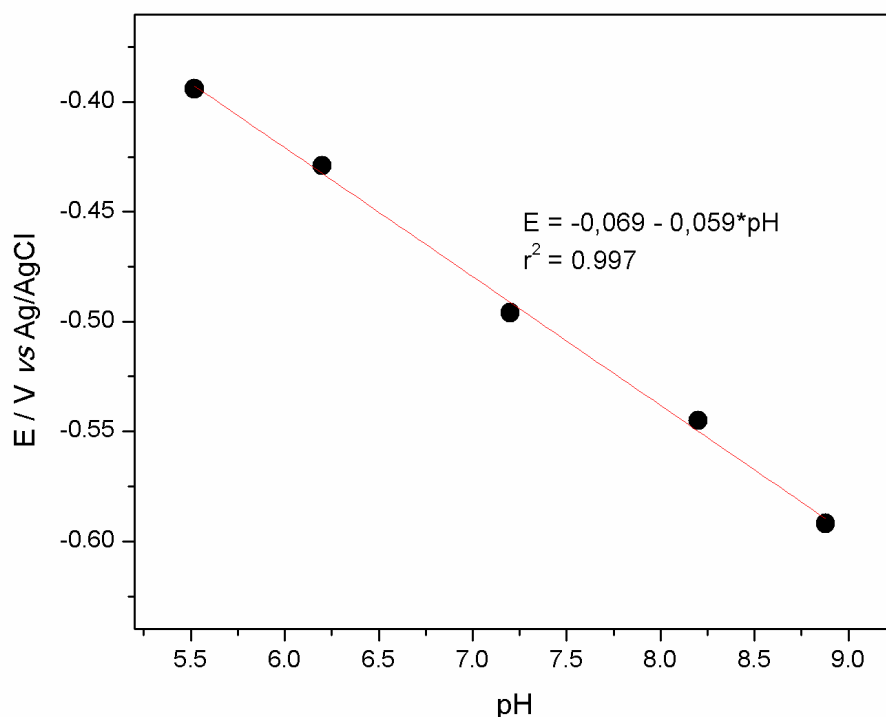


Figura 14. Dependência do potencial do pico anódico em função do pH

4.3. ESTUDOS PRELIMINARES

O objetivo destes ensaios foi verificar a influência na resposta voltamétrica de determinadas variáveis de processo como tamanho da gota e tempo de equilíbrio, e também as variáveis de mistura, como tipos de eletrólitos e suas concentrações. A triagem destes parâmetros foi realizada de maneira univariada.

4.3.1. Tamanho da gota

Foram realizadas varreduras, variando o tamanho da gota de 0,15 a 0,60 mm². Visando estabelecer qual o tamanho da gota produz a melhor resposta voltamétrica do complexo (Figura 15). Não houve uma variação linear nas respostas obtidas entre os tamanhos 0,43 a 0,60 mm², assim sendo, o tamanho da gota foi fixado em 0,43 mm². A escolha da gota em tamanhos maiores contribui para o aumento tanto da corrente faradaica quanto para a corrente capacitiva induzindo a uma resposta da corrente elevada, mas com grande contribuição da corrente capacitiva.

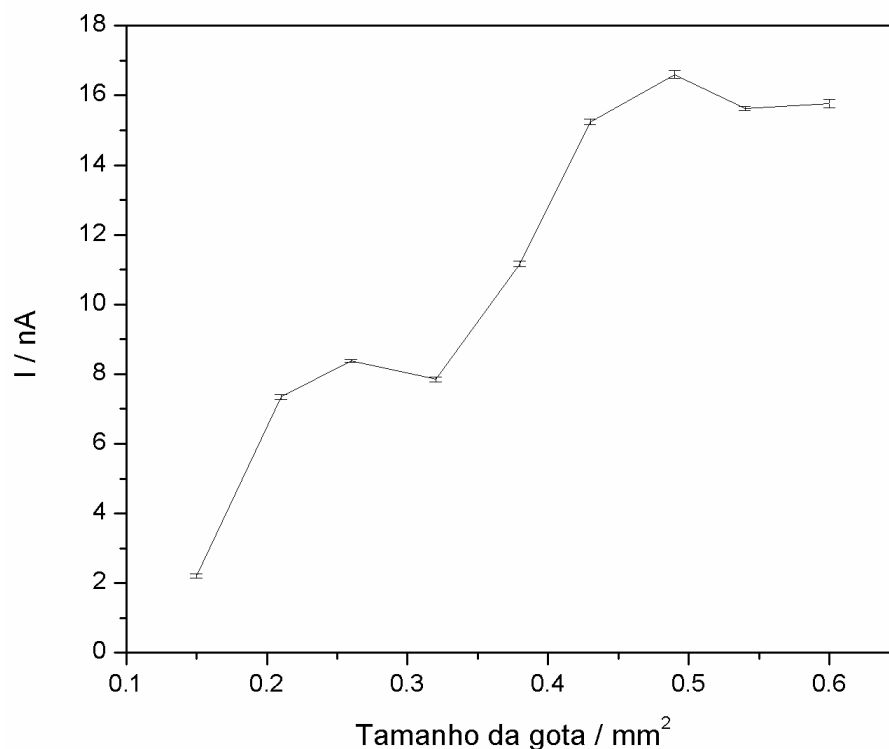


Figura 15. Variação da resposta voltamétrica do complexo VAS–B em função do tamanho da gota na presença de VAS $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, velocidade de varredura $4,6 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.2. Tempo de equilíbrio

A variável de processo, tempo de equilíbrio ou tempo de repouso, é importante para que ocorra uma homogeneização da espécie eletroativa após sua deposição na superfície do eletrodo. O tempo de repouso permite que o transporte da espécie eletroativa ocorra apenas por difusão e não por convecção. Para análise desta variável foram empregados tempos de equilíbrio de 0 a 20 s antes da varredura anódica. Os resultados, Figura 16, mostram que em um tempo de equilíbrio de 5 s obtém-se um resultado ótimo para determinação de boro, com uma maior sensibilidade para o sinal voltamétrico. Portanto, este tempo foi utilizado por todo estudo.

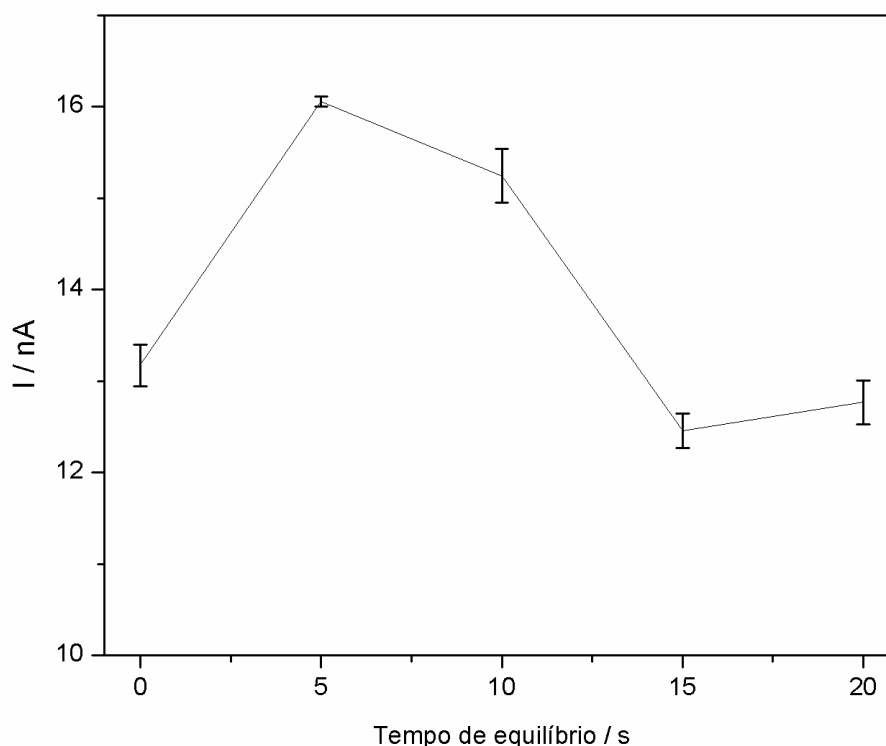


Figura 16. Análise do tempo de equilíbrio no sinal voltamétrico do complexo VAS-B na presença de VAS $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0. Velocidade de varredura $4,6 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.3. Eletrólito de suporte

O aumento da intensidade da corrente faradáica no potencial de meia onda do analito, com consequente aumento na sensibilidade do método, é função também do eletrólito de suporte. Com este objetivo vários eletrólitos em diferentes valores de pH foram avaliados, como ácido acético / hidróxido de amônio, ácido cítrico / hidrogenofosfato de sódio, carbonato / bicarbonato de sódio, amônio / cloreto de amônio, acetato de sódio / biftalato de potássio, acetato de amônio / fosfato de sódio, acetato de amônio / ácido clorídrico e acetato de amônio. Dentre estes o que apresentou as melhores resoluções no pico voltamétrico e sensibilidade foi o ácido acético / hidróxido de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o qual foi utilizado para os estudos subsequentes.

4.3.4. Concentração do VAS

Um estudo da concentração do agente complexante vermelho de alizarina S foi realizado e verificou-se que, em concentrações superiores a 1 mmol L^{-1} ocorre um aumento da corrente de pico referente ao ligante livre. Isto contribuiu para aumentar a base do pico ocorrendo uma sobreposição ao pico do complexo, inviabilizando a determinação de boro em amostra com baixas concentrações deste elemento devido provavelmente a competição do ligante livre com o complexo na superfície do eletrodo. Também foram testadas concentrações do ligante inferiores a $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, mas a resposta de corrente referente ao complexo não foi satisfatória. Portanto, foi escolhida a concentração de $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, para todo o experimento, por apresentar o melhor sinal voltamétrico permitindo a determinação de boro em uma extensa faixa de concentração.

4.4. EXPERIMENTO DE TRIAGEM

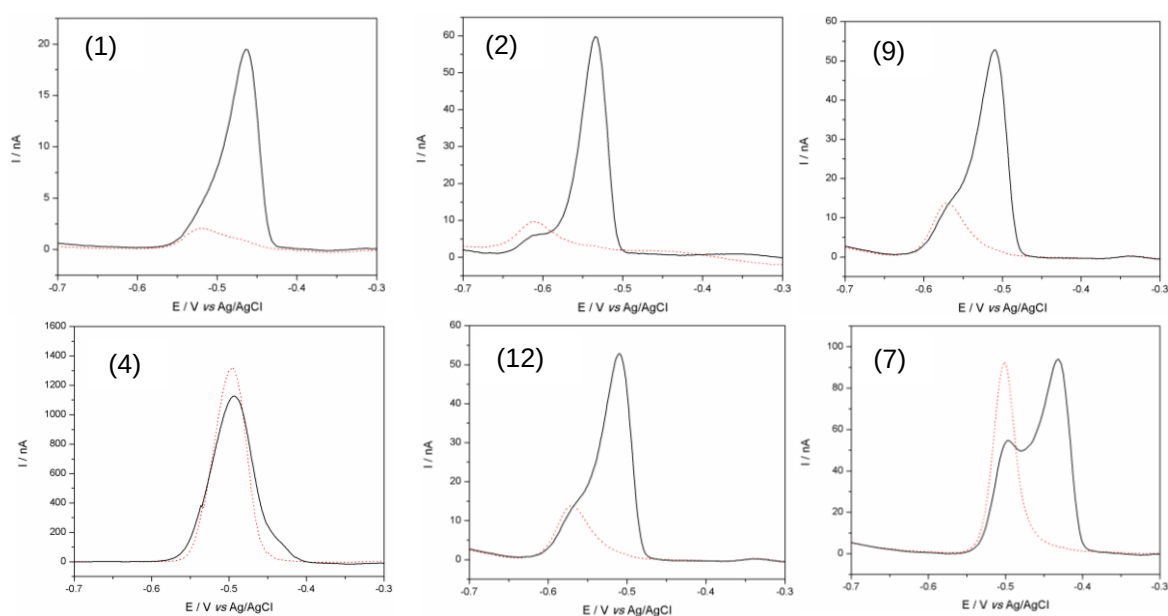
Diferentes parâmetros operacionais influenciam na resposta eletroanalítica. Sendo assim, através do planejamento do tipo Plackett-Burman foi realizado um *screening* com o objetivo de identificar quais fatores são importantes para a construção do planejamento experimental. Inicialmente foram utilizados os fatores selecionados na Tabela 1, pH, potencial de acumulação (PA), tempo de acumulação (TP), amplitude de pulso (AP), tempo de pulso (TP), incremento de voltagem (IV) e incremento de tempo (IT). Adotando a ordem aleatória dos experimentos foi obtida a matriz do planejamento experimental de Plackett-Burman com os valores codificados das variáveis independentes. As respostas voltamétricas foram obtidas pela razão da altura pela largura à meia altura do pico do complexo VAS-B (Equação 2), mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz do planejamento Plackett-Burman com valores codificados das variáveis independentes e respostas voltamétricas do complexo VAS-B

Experimento*	Variáveis							Respostas (A V ⁻¹)
	pH	PA	TA	AP	TP	IV	IT	
1	-	-	-	+	+	+	-	431,75
2	+	-	-	-	-	+	+	1510,00
9	0	0	0	0	0	0	0	1238,65
4	+	+	-	+	-	-	-	10,00
12	0	0	0	0	0	0	0	1120,26
7	-	+	+	-	-	+	-	1929,73
5	-	-	+	+	-	-	+	877,88
11	0	0	0	0	0	0	0	1386,49
10	0	0	0	0	0	0	0	1382,97
8	+	+	+	+	+	+	+	420,00
3	-	+	-	-	+	-	+	381,75
6	+	-	+	-	+	-	-	207,53

* ordem de execução do experimento

Os voltamogramas obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman estão dispostos na Figura 17, na ordem em que foram realizados.



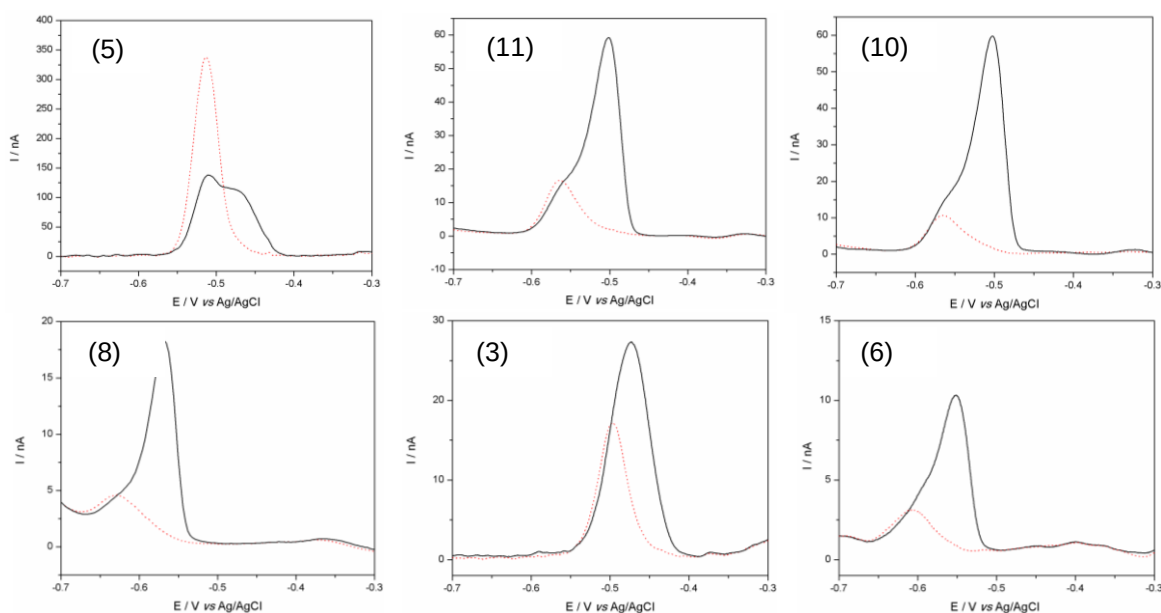


Figura 17. Voltamogramas obtidos através do planejamento Plackett-Burman (....) VAS e (—) VAS-B, seguindo a sequência da Tabela 4

A melhor resposta de corrente do complexo VAS-B observada foi no experimento 7, onde as variáveis potencial de acumulação, tempo de acumulação, incremento de voltagem, apresentavam os maiores níveis da faixa investigada enquanto pH, amplitude de pulso tempo de pulso e incremento de tempo os menores níveis.

Como no planejamento do tipo Plackett-Burman é possível estimar apenas os efeitos principais, foi utilizado o gráfico de Pareto, Figura 18, no qual é apresentada a análise estatística dos efeitos das variáveis sobre a resposta voltamétrica. Através deste gráfico podemos observar, ao nível de 95% de confiança, que as variáveis tempo de pulso (TP), incremento de voltagem (IV), amplitude de pulso (AP) e pH foram estatisticamente significativas. Além disso, observa-se que as variáveis tempo de acumulação, incremento de tempo e potencial de acumulação não apresentam efeitos significativos. As variáveis tempo de pulso, amplitude de pulso e pH exercem efeito negativo sobre a intensidade de corrente do complexo, ou seja, os melhores valores das respostas de corrente são obtidos no nível baixo (–) estabelecido no planejamento enquanto, a variável incremento de voltagem exerce um efeito positivo obtendo melhores respostas no nível alto (+) do planejamento.

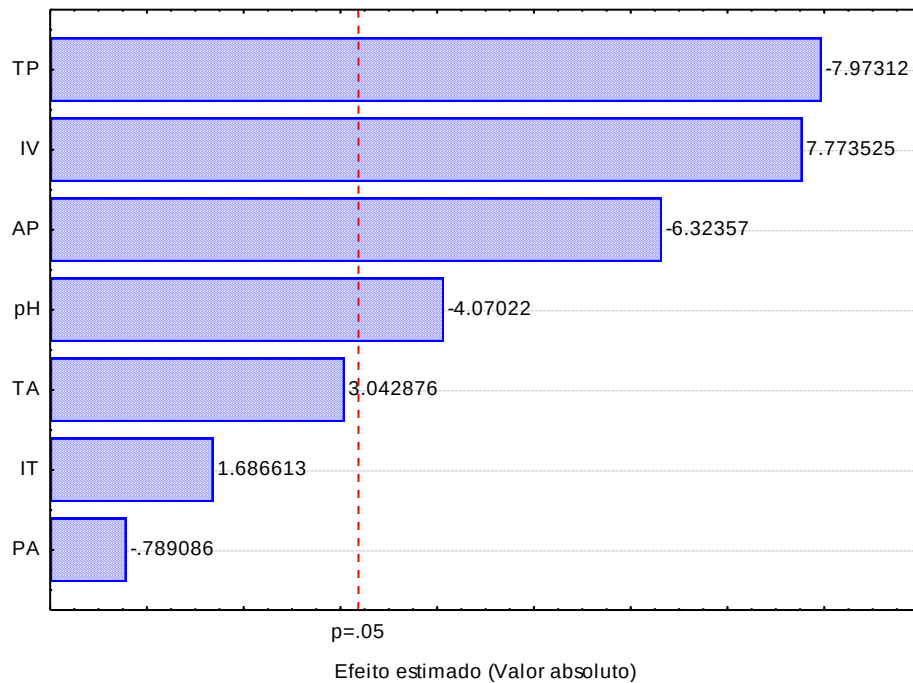


Figura 18. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento Plackett-Burman

Como consequência dos resultados do planejamento, pode ser inferido que o tempo de pulso foi a variável que afetou mais significativamente a intensidade da corrente do complexo VAS–B. O valor negativo de seu efeito significa que a resposta foi favorecida em valores ainda menores de tempo, mas, a diminuição deste tempo aumentaria a contribuição da corrente capacitiva induzindo a uma resposta errônea, superestimada. Assim sendo, o tempo de pulso foi fixado em seu menor nível (–), de 10 ms.

A variável incremento de tempo não foi significativa, sendo fixada no menor nível (–) de 0,2 s, para garantir um maior número de pontos no voltamograma e, consequentemente, melhor resolução.

Como a relação entre os parâmetros incremento de voltagem e incremento de tempo é a velocidade de varredura, e a variável incremento de tempo foi fixada por não ter efeito significativo, a variável velocidade de varredura foi utilizada como parâmetro para otimização. Isto porque variando apenas o fator incremento de voltagem, diferentes valores de velocidade de varredura são obtidos.

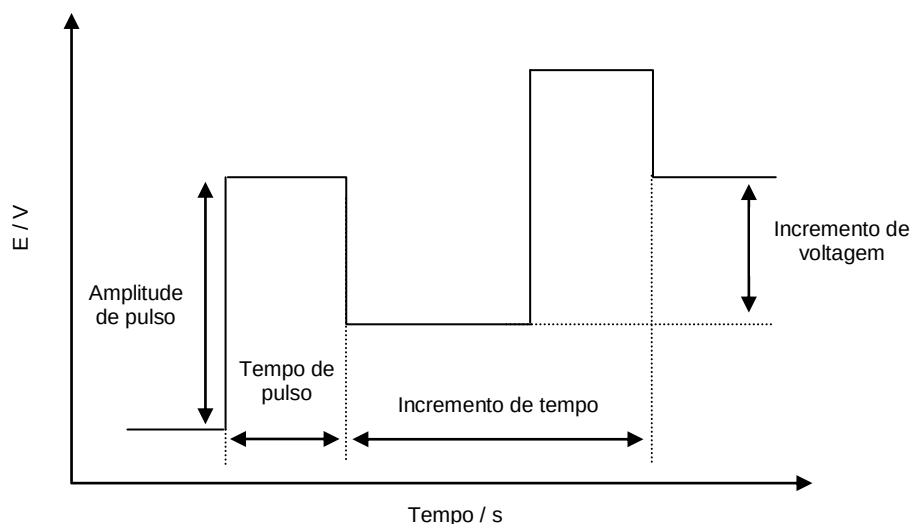


Figura 19. Parâmetros voltamétricos utilizados em voltametria de pulso diferencial (Manual *Software* – Metrohm)

Pode ser verificado que as variáveis, potencial de acumulação e tempo de acumulação não interferem na intensidade da corrente. Portanto, quaisquer dos níveis estudados poderiam ser escolhidos e neste caso os níveis fixados foram de -800 mV e 0 s, respectivamente. Observou-se que empregando qualquer tempo de acumulação havia sobreposição do pico correspondente ao ligante sobre o complexo, provavelmente devido à saturação do eletrodo.

Entretanto, alguns trabalhos foram publicados envolvendo os métodos voltamétricos adsorptivos de redissolução anódico e catódico (BELLIDO *et al.*, 2009; HENG LI *et al.*, 2008; HENG LI *et al.*, 2007; HENG LI *et al.*, 2005; KOMURA *et al.*, 2000) para determinação de metais pela complexação destes com o vermelho de alizarina S. Nestas análises foram empregados tanto eletrodos sólidos quanto os de mercúrio.

4.5. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após a triagem dos fatores, através do planejamento do tipo Plackett-Burman, foi executada a Metodologia de Superfície de Resposta empregando o planejamento composto central (Central Composite Design – CCD) para as variáveis independentes selecionadas, pH, amplitude de pulso e velocidade de varredura, de acordo com o planejamento de triagem.

Os níveis do planejamento composto central foram definidos conforme mostrados na Tabela 5. Os valores codificados axiais α , foram obtidos através da Equação 5.

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad \text{Equação 5}$$

sendo que $k = 3$ (número de variáveis). A Figura 20 esboça os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelos eixos Z_i .

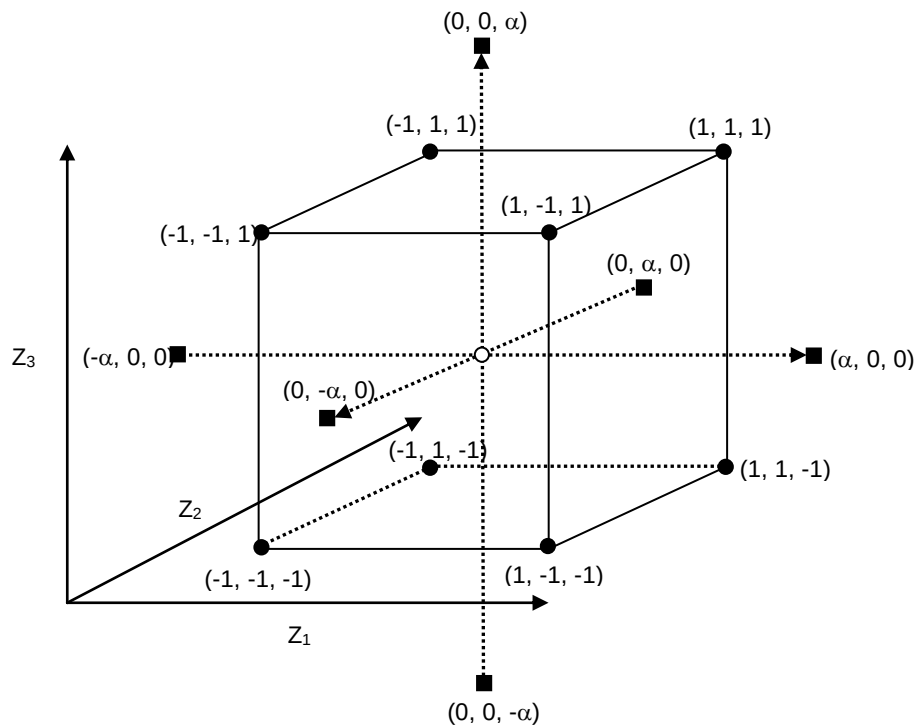


Figura 20. Planejamentos compostos centrais: $k = 3$ e $\alpha = \pm 1,682$ (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (○) ponto central (TEÓFILO & FERREIRA, 2006)

A elaboração do planejamento experimental, os valores dos pontos axiais, do ponto central e o nível do planejamento fatorial 2^3 , foram codificados segundo a Equação 6.

$$Z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\frac{\Delta x}{2}} \quad \text{Equação 6}$$

onde Z_i é o valor codificado procurado para o nível do planejamento CCD, x_i o valor experimental do nível, $\bar{x}$ é o valor médio entre os níveis alto (+1) e baixo (-1) e Δx é a diferença entre os níveis +1 e -1.

A matriz do planejamento CCD realizado, na ordem de execução, com valores dos níveis codificados e as respostas obtidas pela razão da altura pela largura à meia altura do pico encontra-se na Tabela 5. Com as repetições no ponto central foi possível fazer a estimativa do erro puro dos coeficientes.

Tabela 5. Matriz do planejamento composto central com valores codificados e as respostas do sinal voltamétrico do complexo VAS-B

Experimento*	Níveis			Respostas (A V ⁻¹)
	pH	AP	V	
10	-1	-1	-1	1264,86
2	-1	-1	+1	1484,05
14	-1	+1	-1	1621,79
17	-1	+1	+1	1611,62
7	+1	-1	-1	1272,00
15	+1	-1	+1	839,71
11	+1	+1	-1	1171,71
3	+1	+1	+1	691,18
6	-1,68	0	0	487,25
5	+1,68	0	0	627,43
13	0	-1,68	0	1350,00
18	0	+1,68	0	2199,71
1	0	0	-1,68	2536,22
4	0	0	+1,68	1343,42
16	0	0	0	1921,71
8	0	0	0	1741,08
19	0	0	0	2017,03
12	0	0	0	2226,22
9	0	0	0	2142,57

* ordem de execução do experimento

Os voltamogramas obtidos, após execução do planejamento composto central, estão representados pela Figura 21.

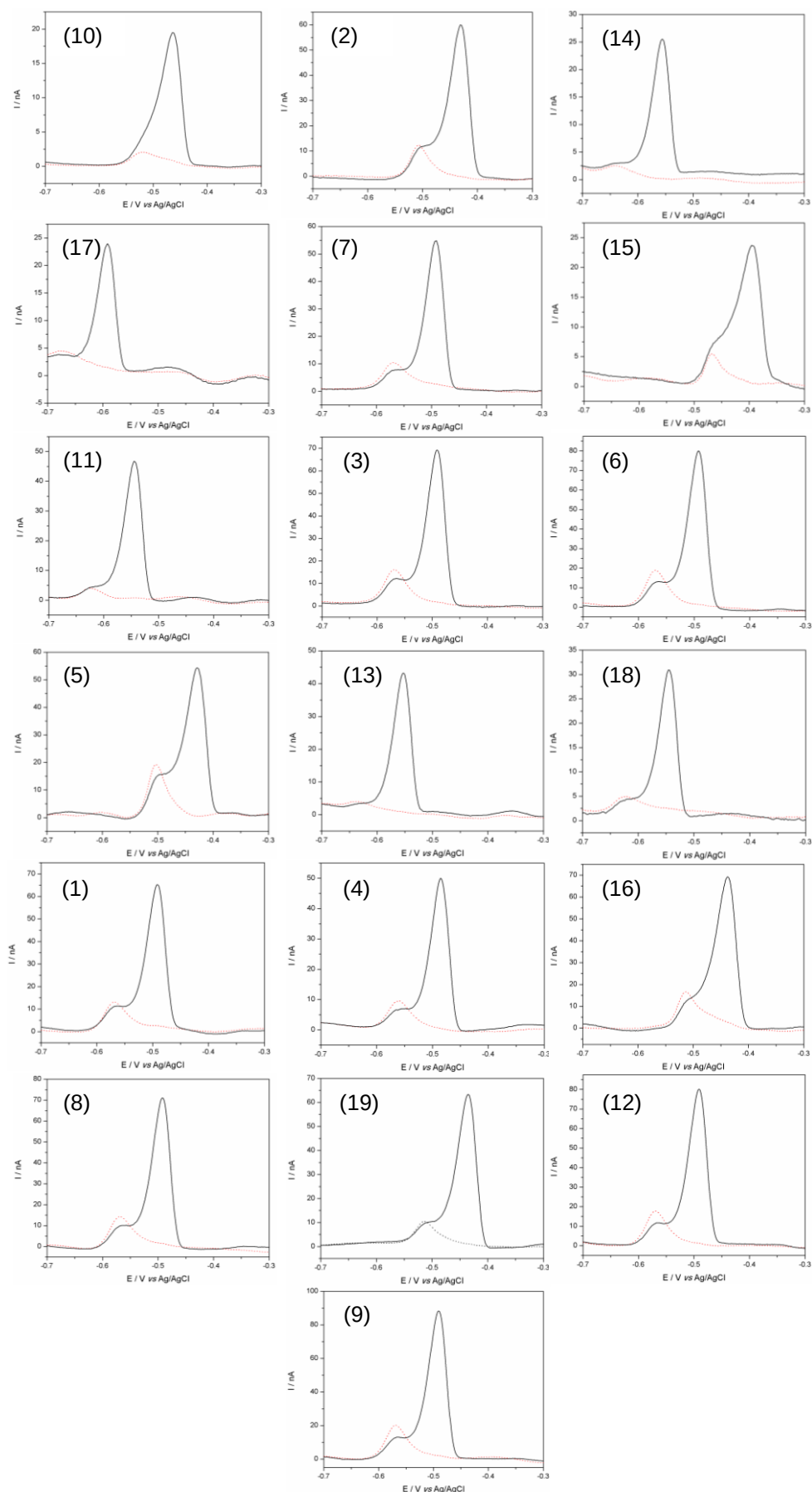


Figura 21. Voltamogramas obtidos através do planejamento composto central
(....) VAS e (—) VAS-B, seguindo a sequência da Tabela 5

A Tabela 6 apresenta os coeficientes do modelo da regressão, erros e limites de confiança para a resposta voltamétrica ao nível de 95% de confiança, os quais foram calculados pelo *software* Statistica 7.0. Observa-se que para as variáveis independentes destacadas, termo linear da velocidade de varredura e termo quadrático do pH, influenciaram significativamente a resposta voltamétrica.

Tabela 6. Coeficientes e erros para o modelo da superfície de resposta

	Coeficientes	±	Erro puro	t	p
b_0	2016,21	±	84,96	23,71	2×10^{-5}
pH	-129,73	±	51,43	2,52	0,065
AP	121,90	±	51,43	2,37	0,077
v	-196,82	±	50,53	3,89	0,018
pH^2	-545,01	±	51,57	10,57	5×10^{-4}
AP^2	-114,66	±	51,57	2,22	0,09
v^2	-50,02	±	48,10	1,04	0,357
pH · AP	-91,67	±	67,20	1,36	0,244
pH · v	-140,23	±	67,20	2,09	0,105
AP · v	-34,70	±	67,20	0,52	0,633

* $t_{\text{tab}}(4) = 2,78$

A Tabela 7 exibe a análise de variância (ANOVA) do modelo estimado. Com base nestes resultados, observa-se que o modelo foi satisfatório por ser estatisticamente significativo, ao nível de 95% de confiança. Além disso, não houve falta de ajuste garantindo um modelo quadrático bem ajustado aos valores experimentais da resposta em cada ponto do planejamento. O modelo apresentado na Equação 7 descreve o comportamento da resposta em função da velocidade de varredura e do pH, dentro dos limites estudados.

Tabela 7. Análise de variância do planejamento composto central

	SQ	GL	MQ	F
Regressão	5×10^6	9	587369	5,96
Resíduos	887295	9	98588	
Falta de ajuste	742807	5	148561	4,11
Erro puro	144488	4	36122	
Total	6×10^6	18		
% de variação explicada			85,63	
% máxima de variância explicada			97,66	

* $F_{\text{tab}}(9,9) = 3,18$

** $F_{\text{tab}}(5,4) = 6,26$

A Equação 7 apresenta um modelo quadrático codificado ajustado que descreve a resposta em função das variáveis independentes analisadas, pH e velocidade de varredura dentro dos níveis estudados no planejamento composto central.

$$R = 2014,34 - 196,82 v - 545,01 \text{ pH}^2 \quad \text{Equação 7}$$

$\pm 84,96 \quad \pm 50,53 \quad \pm 51,57$

Os gráficos da Figura 22, mostram as respostas observadas vs respostas previstas (A) e as respostas previstas vs resíduos (B), confirmam a qualidade do ajuste do modelo em questão e conforme pode ser verificado os desvios estão distribuídos aleatoriamente, mostrando que são devidos a erros indeterminados e não sistemáticos.

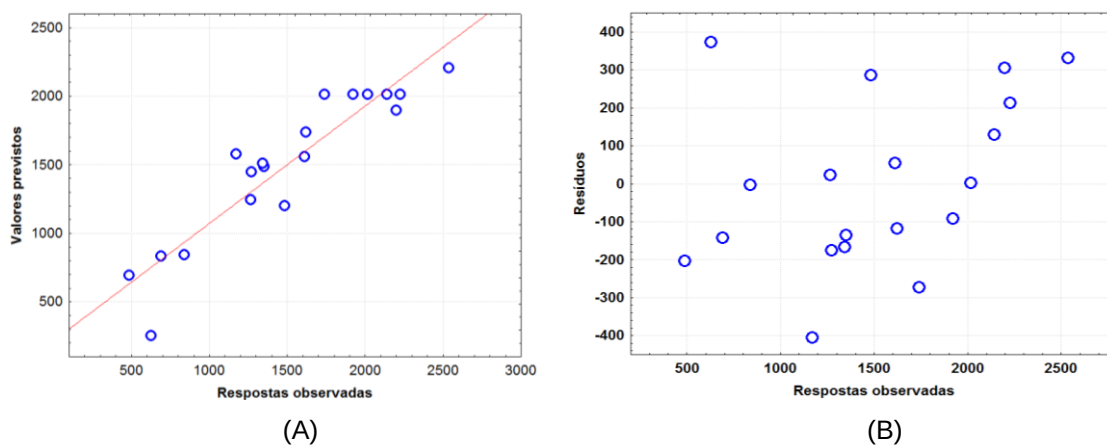


Figura 22. Distribuição dos resíduos: Gráfico (A) Respostas previstas pelo modelo vs Respostas observadas no experimento; Gráfico (B) Respostas observadas vs Resíduos.

Com o modelo empírico validado, foi possível a construção da superfície de resposta, mostrada na Figura 23.

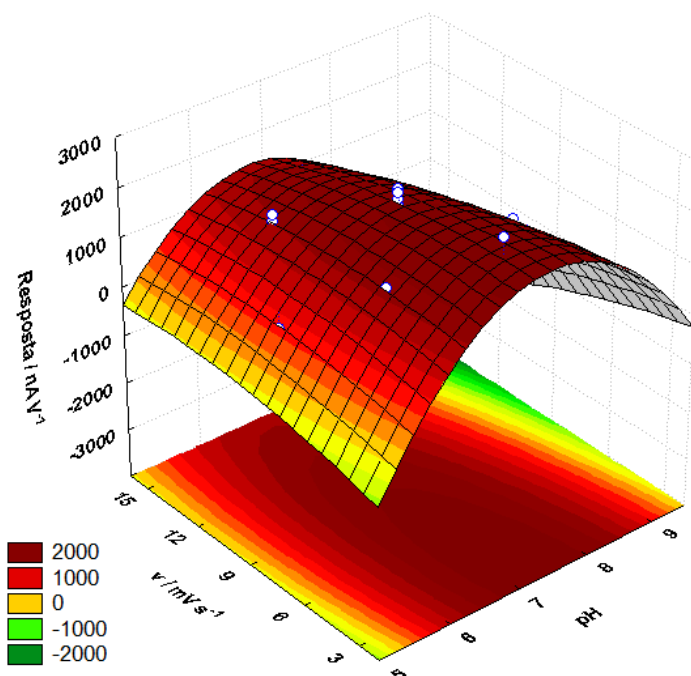


Figura 23. Superfície de resposta mostrando a resposta de corrente em função dos valores decodificados de velocidade de varredura e pH

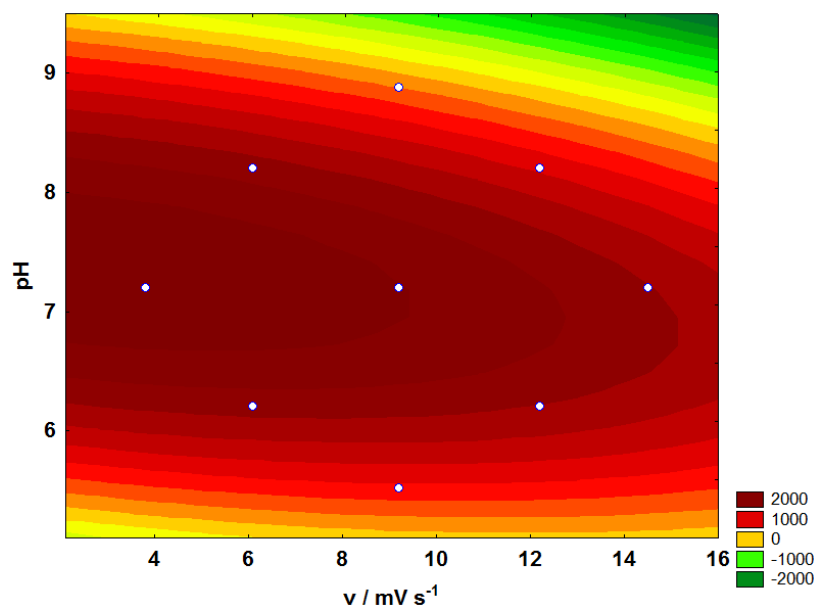


Figura 24. Curvas de nível da resposta de corrente do complexo VAS-B

A Figura 24 apresenta as curvas de nível do modelo quadrático e através dela verifica-se que a resposta máxima é obtida no menor nível de varredura e em de pH próximo de 7,0.

Após a otimização dos parâmetros, os valores ótimos e as respostas estimada e observada para o complexo VAS-B foram encontrados e são exibidos na Tabela 8. Através do erro relativo é possível verificar o ajuste do modelo matemático ao sistema voltamétrico e a contribuição deste modelo para o aumento da resposta para uma concentração de boro na célula voltamétrica.

Tabela 8. Condições otimizadas da técnica de voltametria de pulso diferencial para análise de boro

Variáveis	Nível ótimo	Resposta estimada
pH	7,2	2211,16 nA V ⁻¹
Tempo de pulso (ms)	10	Resposta observada
Amplitude de pulso (mV)	50	
Incremento de voltagem (mV)	1,221	2320,63 nA V ⁻¹
Incremento de tempo (s)	0,2	Erro relativo: + 4,9 %
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	6,2	

4.5.1. Validação da metodologia

A confiabilidade de um método, para aplicação em uma amostra, é garantida através de sua validação. Para tanto, o método foi submetido à análise da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da repetitividade.

4.5.1.1. Linearidade

Aplicando as condições otimizadas, mostrados na Tabela 8, foi obtido um sinal bem definido em potencial de aproximadamente -0,49 V. Sendo assim, um estudo de linearidade foi realizado empregando a técnica de pulso diferencial para determinação de boro em presença do VAS. Neste estudo, a curva analítica foi obtida com o intuito de analisar a aplicabilidade do método otimizado. A relação linear foi encontrada entre a corrente correspondente à altura do pico obtida *versus* a concentração de boro na célula voltamétrica, em 22 níveis de concentração, com o objetivo de verificar qual a faixa de concentração apresenta relação linear com a resposta voltamétrica.

A dependência do sinal voltamétrico do complexo VAS-B foi obtida através de adições de solução padrão de boro, com concentrações que variaram entre 0,009 e 6,86 mg L⁻¹ na célula voltamétrica.

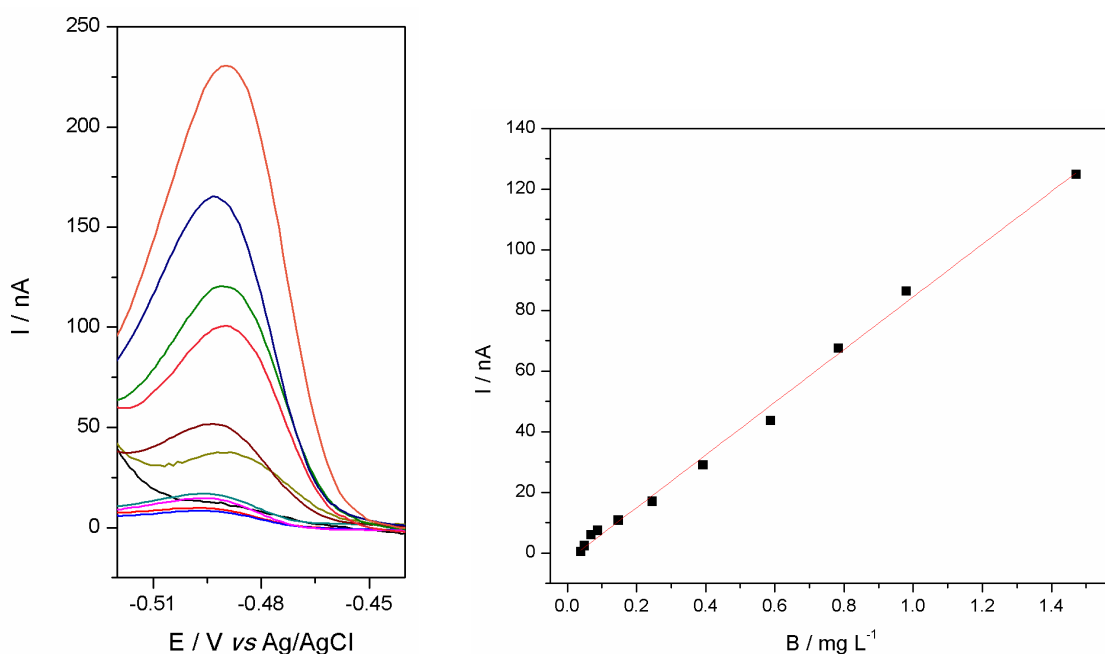


Figura 25. Curva analítica da corrente pico vs concentração de boro para avaliação da faixa de trabalho

Através da análise por quadrados mínimos da concentração de boro vs corrente de pico, verifica-se que há uma relação linear entre 0,032 a 1,47 mg L⁻¹. Através do modelo de regressão (Equação 8) obteve-se um coeficiente de determinação de 0,9958 para n = 11. A Figura 25 exibe os voltamogramas de pulso diferencial obtidos do complexo VAS–B e a relação linear entre a concentração de boro e a corrente observada.

$$I \text{ (nA)} = -2,41 + 86,9 \times C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 8}$$

onde I é o sinal da corrente em nanoamperes e C é a concentração de boro analisado, em µg L⁻¹.

4.5.1.2. Limites de detecção e quantificação

O desvio padrão do branco da metodologia voltamétrica para determinação de boro foi calculado através de sete repetições do branco (VAS e eletrólito de suporte) realizadas em um mesmo dia, sob as mesmas condições de análise para amostras sem qualquer resíduo de boro. Os limites foram calculados com o auxílio das Equações 3 e 4, obtendo-se LD = 9,72 µg L⁻¹ e LQ = 32,4 µg L⁻¹.

Com os resultados obtidos verifica-se que após o emprego de planejamentos experimentais a metodologia proposta apresentou limites de detecção e de quantificação inferiores ao descritos na literatura empregando a mesma técnica.

4.5.1.3. Repetitividade

Uma maneira de avaliar a precisão do método é através da repetitividade. A repetitividade das respostas voltamétricas, independentes, foi avaliada através de cinco replicatas de uma solução padrão boro de 40 µg L⁻¹. As análises foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições, obtendo um desvio padrão relativo (RSD) de 3,21%. Com este

resultado verifica-se a boa repetitividade e o baixo desvio, mesmo em concentração próxima ao limite de quantificação, mostrando a confiabilidade do método.

5

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A metodologia empregando voltametria de pulso diferencial, juntamente com o eletrodo de mercúrio de gota pendente evidenciaram a viabilidade da técnica na determinação de boro mostrando-se simples e precisa. A técnica apresentou algumas vantagens sobre o método espectrofotométrico da Azomethina-H, sobretudo no tempo de reação, já que a reação de complexação entre o VAS-B se processa rapidamente.

A etapa de otimização mostrou-se muito importante para a eficácia do método na determinação de boro, utilizando como eletrólito de suporte o ácido acético / hidróxido de amônio e o agente complexante vermelho de alizarina S. Sua importância foi comprovada, pois através do uso da metodologia da superfície de resposta foi possível encontrar resultados superiores em comparação àqueles obtidos por SAHIN & NAKIBOGLU (2006).

Para o prosseguimento deste trabalho e aperfeiçoamento da técnica sugere-se a avaliação de eletrodos sólidos e outros agentes complexantes, bem como o estudo mais detalhado de eletrólitos de suporte e a aplicação do método otimizado em amostras ambientais, tais como solo, vegetal e água.

6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.F.; SANTOS, P.H.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A. Extração de substratos para obtenção da concentração de micronutrientes disponíveis para a rúcula. *Horticultura Brasileira*, **2007**, 25, 411-417.

ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; RAIJ, B.V.; BATAGLIA, O.C.; ANDRADE, J.C. Extraction of boron from soil by microwave heating for ICP-AES determination. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **1994**, 25, 3321-3333.

ACCIOLY, J.C.; NEVES, M.F.C. Determinação de boro em águas do estado do Piauí. *Ciência Agrônômica*, **1976**, 6, 3-5.

ACUÑA, A.M. Los suelos como fuente de boro para lãs plantas. *Revista UDO Agrícola*, **2005**, 5, 10-26.

ALGHAMDI, A.H. Determination of zinc by square-wave adsorptive stripping voltammetry using alizarin as a chelating agent. *Journal of Saudi Chemical Society*, **2010**, 14, 1-7.

ASAD, A.; BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G. Effects of boron foliar aplication on vegetative and reproductive growth on sunflower. *Annals of Botany*, **2003**, 92, 565-570.

ASLAN, N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. *Powder Technology*, **2008**, 185, 80-86.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. *John Wiley & Sons*, **2001**. 833 p.

BARD, A.J.; ZOSKI, C.G. Voltammetry Retrospective. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 346 A-352 A.

BELLIDO, E.E.; RIAÑO, M.D.G.; VARGAS, M.G. Sensitive adsorptive stripping voltammetric method for determination of lead in water using multivariate analysis for optimization. *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 166, 1326-1331.

BERGER, C.K; PRATT, P.F. Advances in secondary and micronutrients fertilization. *Soil Science Society of America Journal*, **1963**, 287-340.

BOLAÑOS, L.; LUKASZEWSKI, K.; BONILLA, I.; BLEVINS, D. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*, **2004**, 42, 907-912.

BRASIL, J.L.; VAGHETTI, J.C.P.; ROYER, B.; SANTOS JUNIOR, A.A.; SIMON, N.M.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; LIMA, E.C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. *Química Nova*, **2007**, 30, 548-553.

BRASIL. Resolução nº 397, de 03 de abril de 2008, Altera o artigo 34 da Resolução do CONAMA nº 357, de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da União, nº 66 de 07 de abril de 2008, pags. 68-69.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, **2003**, 123, 129-146.

BROADBENT, A.D.; HEWSON, W.D.; MCDONALD, H.A.; MELANSON, R.J. Polarographic studies of the interaction of boric acid with 1-hydroxy and 1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinones and -anthrahydroquinones. *Canadian Journal of Chemistry*, **1977**, 2946-2952.

BROWN, P.H.; BELLALLOUI, N.; WIMMER, M.A.; BASSIL, E.S.; RUIZ, J.; HU, H.; PFEFFER, H.; DANNEL, F.; RÖMHELD, V. Boron in plant biology. *Plant Biologic*, **2002**, 4, 205-223.

BUFFLE, J.; WAEBER, M.L.T. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to *in situ* measurerents. *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, 24, 171-191.

CAMPAÑA, A.M.G.; BARRERO, F.A.; CEBA, M.R. Spectrofluorimetric determination of boron in soils, plants and natural waters with alizarin red S. *Analyst*, **1992**, 117, 1189-1191.

CARRERO, P.; MALVÉ, A.; ROJAS, E.; RONDÓN, C.; PEÑA, Y.P.; BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. On-line generation and hydrolysis of methyl borate for the spectrophotometric determination of boron in soil and plants with azomethine-H. *Talanta*, **2005**, 68, 374-381.

CARTER, M.R.; GREGORICH, E.G. Soil Sampling and Methods of Analysis. 2^a Ed., *Canadian Society of Soil Science*, **2008**. 1263 p.

CENGELÖGLU, Y.; ARSLAN, G.; TOR, A.; KOCAK, I.; DURSUN, N. Removal of boron from water by using reverse osmosis. *Separation and Purification Technology*, **2008**, 64, 141-146.

CENGELÖGLU, Y.; TOR, A.; ARSLAN, G.; ERSOZ, M.; GEZGIN, S. Removal of boron from aqueous solution by using neutralized red mud. *Journal of Hazardous Materials*, **2007**, 142, 412-417.

CHAVES, F.S.; NOGUEIRA, A.R.A.; DE SOUZA, G.B.; PRIMAVESI, A.C. Avaliação de procedimento de extração e determinação de boro em amostras de solo. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 5 – EMBRAPA*, **2006**, 41 p.

ÇÖL, M.; ÇÖL, C. Enviromental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya Province of Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, **2003**, 41, 1417-1420.

COPELAND, T.R.; CHRISTIE, J.H.; OSTERYOUNG, R.A.; SKOGERBOE, R.K. Analytical applications of pulsed voltammetric stripping at thin film mercury electrodes. *Analytical Chemistry*, **1973**, 45, 2171-2174.

CORDEIRO, C.R.B.; MARQUES, A.L.B.; MARQUES, E.P.; CARDOSO, W.S.; ZHANG, J. Ultra trace copper determination by catalytic-adsorptive stripping voltammetry using an alizarin red S modified graphite electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, **2006**, 1, 343-353.

DARBOURET, D; KANO, I.; Ultrapure water blanck for boron trace analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2000**, 15, 1395-1399.

DATTA, S.P.; RATTAN, R.K.; SURIBABU, K.; DATTA, S.C. Fractionation and colorimetric determination de boron in soils. *Journal Plant Nutritional Soil Science*, **2002**, 165, 179-184.

DAVIS, S.M.; DRAKE, K.D.; MAIER, K.J. Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*. *Chemosphere*, **2002**, 48, 615-620.

DENG, P.; FEI, J.; ZHANG, J.; LI, J. Determination of trace copper by adsorptive voltammetry using a multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. *Electroanalysis*, **2008**, 20, 1215-1219.

ECONOMOU, A.; THEMELIS, D.G.; BIKOU, H.; TZANAVARAS, P.D.; RIGAS, P.G. Determination of boron in water and pharmaceuticals by sequential-injection analysis and fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 510, 219-224.

ESTEBAN, M.; ARIÑO, C.; DÍAZ-CRUZ, J.M. Chemometric for the analysis of voltammetric data. *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25, 86-92.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.P.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; NETO, B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1158, 2-14.

FURNALETTO, S.; ORLANDIN, S.; ALDINI, G.; GOTTI, R.; DREASSI, E.; PINZAUTI, S. Designing experiments to optimize and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesilude. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 413, 229-239.

GARCÍA, I.L.; CÓRDOBA, M.H.; PEDREÑO, C.S. Sensitive method for the spectrophotometric determination of boron in plants and waters using crystal violet. *Analyst*, **1985**, 110, 1259-1262.

GOLDBERG, S. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*. **1997**, 193, 35-48.

GUPTA, U.C. Boron and its role in crop production. *CRC Press*, **1993**, 237 p.

GUPTA, U.C. Relationship of total and hot-water soluble boron, and fixation of added boron, to properties of podzol soils. *Soil Science Society of American*, **1968**, 32, 45-48.

HE, Z.L.; YANG, X.E.; STOFFELLA, P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Element in Medicine and Biology*, **2005**, 19, 125-140.

HENG LI, Y.; WANG, Y.X.; HUANG, M.H. Determination of trace vanadium by adsorptive stripping voltammetry at a carbon paste electrode. *Electroanalysis*, **2008**, 13, 1440-1444.

HENG LI, Y.; ZHAO, Q.L.; HUANG, M.H. Adsorptive anodic stripping voltammetry of zirconium(IV)-alizarin red S complex at a carbon paste electrode. *Microchimica Acta*, **2007**, 157, 245-249.

HENG LI.; Y, ZHAO, Q.L.; HUANG, M.H. Cathodic adsorptive voltammetry of the gallium-alizarin red S complex at a carbon paste electrode. *Electroanalysis*, **2005**, 17, 343-347.

HONG DENG, P.; ZHANG, J.; LIAO, S.F.; LI, J.N. Adsorption voltammetry of the zirconium-alizarin red S complex at a multi-walled carbon nanotubes modified carbon paste electrode. *Microchimica Acta*, **2008**, 161, 123-128.

HU, H.; BROWN, P.H. Absorption of boron by plants roots. *Plant and Soil*, **1997**, 193, 49-58.

JACKSON, M.L. Chemistry of the soil. New York: Reinhold Publishing Corporation, **1964**, p. 71-141.

KAFTAN, O.; AÇIKEL, M.; EROGLU, A.E.; SHAHWAN, T.; ARTOK, L.; NI, C. Synthesis, characterization and application of a novel sorbent, glucamine-modified MCM-41, for the removal/preconcentration of boron from waters. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 547, 31-41.

KALAVATHY M., H.; REGUPATHI, I.; PILLAI, M.G.; MIRANDA, L.R. Modelling, analysis and optimization of adsorption parameters for H₃PO₄ activated rubber wood sawdust using response surface methodology (RSM). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2009**, 70, 35-45.

KALVACI, S.; YALAMAÇ, E.; AKKURT, S. Effects of boron addition and intensive grinding on synthesis of anorthite ceramics. *Ceramics International*, **2008**, 34, 1629-1635.

KEREN, R.; BINGHAM, F.T. Boron in water, soils, and plants. *Advances in Soil Sciences*, **1985**, 1, 229-276.

KEREN, R.; GAST, R.G.; BAR-YOSEF, B. pH-dependent boron adsorption by Namontmorillonite. *Soil Science Society of America Journal*, **1981**, 48, 555-559.

KOMURA, T.; ISOGAI, S.; YAMAGUCHI, T.; TAKAHASHI, K. Voltammetric behavior of 1,2-dihydroxyanthraquinones attached to glassy carbon electrodes and their surface complexation with copper. *Journal Electroanalytical Chemistry*, **2000**, 490, 70-78.

LI, W.; NADIG, D.; RASMUSSEN, H.T.; PATEL, K., SHAH, T. Sample preparation optimization for assay of active pharmaceutical ingredients in a transdermal drug delivery system using experimental designs. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, **2005**, 37, 493-498.

LINDSAY, W.L.; COX, F.R. Micronutrient soil testing for the tropics. *Fertilizer Research*, **1985**, 7, 169-200.

LIU, Y.M.; LEE, K. Modifications of the curcumin method enabling precise and accurate measurement of seawater boron concentration. *Marine Chemistry*, **2009**, 115, 110-117.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, **2006**. 638 p.

MATSUO, H.; MIYAZAKI, Y.; TAKEMURA, H.; MATSUOKA, S.; SAKASHITA, H.; YOSHIMURA, K. ¹¹B NMR study on the interaction of boric acid with azomethine H, *Polyhedron*, **2004**, 23, 955-961.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of Plant Nutrition. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, **2001**, 859p.

NI, Y.; KOKOT, S.; Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis? *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 626, 130-146.

NIELSEN, F.H. Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, **2008**, 66, 183-191.

OMS, Organization Mundial de la Salud. Guias para la calidad del agua potable. Genebra, **1999**.

OZCAN, H.; YILMAZ, S. Determination of boron in the waters of Troia by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2005**, 70, 1219-1227.

RAMESHAM, R.; ROSE, M.F. Kinetic studies of hydroquinone/quinine at the boron-doped diamond electrode by cyclic voltammetry. *Journal of Materials Science Letters*, **1997**, 16, 799-805.

RAMOS, S.S.; REIG, F.B.; ADELANTADO, J.V.G.; MARCO, D.J.Y.; CARBÓ, A.D.; PÉREZ, J.A.B. Validation of a method for the determination of boron in ceramic materials by X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, **2000**, 1669-1677.

REIS, C.; REIS, E.L.; SILVA, C.A. Modificação de procedimento para extração de boro em solos. *Ciência & Engenharia*, **2006**, 15, 91-94.

SAH, R.N.; BROWN, P.H. Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soil samples. *Plant and Soil*, **1997**, 193, 15-33.

SAHIN, I.; NAKIBOGLU, N. Voltammetric determination of boron by using Alizarin Red S. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 572, 253-258.

SANZ, J.; PÉREZ, M.; MARTÍNEZ, M.T.; PLAZA, M. Experimental design methodologies to optimize monobutyltin chloride determination by hydride generation gas phase molecular absorption spectrometry. *Talanta*, **1999**, 50, 149-164.

SARICA, D.Y.; ERTAS, N. Flow injection analysis for boron determination by using methyl borate generation and flame atomic emission spectrometry. *Turkish Journal Chemistry*, **2001**, 25, 301-310.

SARKAR, A.; AGGARWAL, S.K.; SASIBHUSAN, K.; ALAMELU, D. Determination of sub-ppm levels of boron in ground water samples by laser induced breakdown spectroscopy. *Microchimica Acta*, **2010**, 168, 65-69.

SHIU, K.K., CHAN, O.Y. Electroanalysis of copper species at polypyrrole-modified electrodes bearing alizarin red S ligands. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1995**, 388, 45-51.

SHORROCKS, V.M. Boron Deficiency: Its Prevention and Cure. Technical Service and Development Department, Borax Consolidated Limited, Londres-Inglaterra, **1985**.

SIMSEK, A.; KORKMAZB, D.; VELIOGLU, Y.S; ATAMAN, O.Y. Determination of boron in hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and spectrophotometry. *Food Chemistry*, **2003**, 83, 293–296.

SULIMAN, F.E.O. Off-line optimization of the separation of 2,4-dinitrophenylhydrazones by gas chromatography using chemometric techniques. *Talanta*, **2002**, 175-183.

SUN, W.; JIAO, K. Linear sweep voltammetric determination of protein nased on its interaction with alizarin red S. *Talanta*, **2002**, 56, 1073-1080.

SUN, D.H.; WATERS, J.K.; MAWHINNEY, T.P. Determination of total boron in soils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using microwave-assisted digestion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **1998**, 12, 2493-2503.

TANAKA, M.; FUJIWARA, T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflugers Arch – European Journal Physiology*, **2008**, 456, 671-677.

TANAKA, T.; NISHU, K.; NABEKAWA, H.; HAYASHI, H., Determination of trace boron in iron and steel by adsorptive stripping voltammetry using beryllon III, *ISIJ International*, **2006**, 46, 1318-1323,.

TARLEY, C.R.T.; SILVEIRA, G.; DOS SANTOS, W.N.L.; MATOS, G.D.; DA SILVA, E.G.P.; BEZERRA, M.A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S.L.C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, **2009**, 92, 58-67.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais. Um tutorial. *Química Nova*, **2006**, 29, 338-350.

THUNUS, L. Voltammetric determination of boron in plasma using Beryllon(III) as a ligand. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 318, 1303-308.

VAN RAIJ, B.; DE ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, SP: *Instituto Agrônomo de Campinas*, **2001**. 285 p.

WANG, J. *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, **2000**. 209 p.

WANG, J.; Adsorptive stripping voltammetry. *Princeton applied research. Application*, Note A-7, **1985**.

WHO, World Health Organization. Environmental Health Criteria 204-Boron. Geneva, **1998**, 201 p.

YAMADA, T. Boro: será que estamos aplicando a dose suficiente para o adequado desenvolvimento das plantas? *Informações Agrônomicas*, **2000**, 90, 1-5.

YNAMA, R. & PRIMAVESI, O. Micronutrientes ou elementos menores completando as adubações, equilibram a fertilidade do solo. 3º ed. S. Paulo, Agrofertil, **1973**.

ZHANG, J.; LI, J.N.; DENG, P.H. Adsorption voltammetry of the scandium-alizarin red S complex onto a carbon paste electrode. *Talanta*, **2001**, 54, 561-566.

ZITTEL, H.E.; FLORENCE, T.M. Voltammetric and spectrophotometric study of the zirconium-alizarin red S complex. *Analytical Chemistry*, **1967**, 39, 320-326.

ZUMAN, P. Role of mercury electrodes in contemporary analytical chemistry. *Electroanalysis*, **2000**, 12, 1187-1194.