A DETERMINAÇÃO DO BORO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DA CURCUMINA

JOSÉ CARLOS ALCARDE
Engenheiro-Agrônomo
Cadeira nº 10
Química Analítica e Físico-Química
E.S.A. "Luiz de Queiroz"
U.S.P.

Tese apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz"
para obtenção do título de
"Doutor em Agronomia"

PIRACICABA
ESTADO DE S.PAULO - BRASIL
1969

E R R A T A

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
8	3	3	banho-maria	banho de água
8	4	11	banho-maria	banho de água
14	6	5	H_2SO_4-$H_4C_2O_2$	H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1)
15	-	1	banho-maria à ebulição	banho-maria
19	3	2	obtidos	obtido
23	-	1	banho-maria à ebulição	banho-maria
59	2	3	silícido	silícico

x-x-x-x-x

A meus pais

A minha espôsa

A meu filho,

dedico.

AGRADECIMENTOS

- ao Dr. Renato Amilcare Catani, Professor Catedrático da Cadeira nº 10, Química Analítica e Físico-Química, pela orientação precisa, pelos conselhos e sugestões, revisão do texto e pelo incentivo durante a realização dêste trabalho.

- ao Dr. Nadir Almeida da Glória, Livre-Docente da Cadeira nº 10, pela atenção prestada durante o transcorrer do trabalho e pela revisão do texto.

- aos colegas, funcionários e demais pessoas, pela colaboração direta ou indireta.

- a Fundação Rockefeller pela doação dos aparelhos utilizados,

somos sinceramente gratos.

I N D I C E

pág.

I - INTRODUÇÃO 1

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

III - PARTE EXPERIMENTAL 10

1 - Estudo sumário sôbre a desprotonação da - curcumina 10

2 - Estudo da velocidade da reação 13

2.1 - Identificação dos fatôres que in- - fluem na velocidade da reação 14

2.1.1 - Influência da quantidade de boro 15

2.1.2 - Influência da concentração da solução de curcumina ... 16

2.1.3 - Influência do volume da solução de curcumina 16

2.1.4 - Influência do volume da solução de ácido sulfúrico-ácido acético (1 + 1) 17

2.1.5 - Influência da água 18

2.2 - Estudo conjunto dos fatôres que influem na velocidade da reação 20

3 - Escolha do comprimento de onda e do filtro 21

4 - Durabilidade dos reagentes 23

5 - Efeito da água absorvida pelo resíduo sêco e pelas soluções reagentes 26

5.1 - Efeito da água absorvida pelo resíduo sêco 27

5.2 - Efeito da água absorvida pelas soluções reagentes 27

6 - Estabilidade do complexo nas condições da reação 28

7 - Influência da temperatura 30

8 - Estudo do solvente e estabilidade da solução colorida 33

9 - Estudo da amplitude, precisão e exatidão do método 36

pág.

9.1 - Amplitude e exatidão 36
9.2 - Precisão 37
10 - Estudo da adsorção do complexo colorido pelo papel de filtro 39
11 - Estudo dos interferentes 41
11.1 - Reconhecimento dos interferentes 42
11.1.1 - Fosfato 43
11.1.2 - Potássio 43
11.1.3 - Cálcio 44
11.1.4 - Magnésio 45
11.1.5 - Cobre 47
11.1.6 - Zinco 47
11.1.7 - Ferro 48
11.1.8 - Molibdênio 49
11.1.9 - Manganês e cobalto ... 49
11.1.10- Alumínio 50
11.2 - Eliminação dos interferentes .. 51
11.2.1 - Comportamento do ânion borato na resina trocadora de cátions 51
11.2.2 - Separação dos cátions interferentes 53
12 - Aplicação do método na determinação do boro em plantas 57
12.1 - Contaminação pelo papel de filtro 57
12.2 - Influência da sílica 59
12.3 - Solubilização do boro contido nas cinzas vegetais 60
12.4 - Estudo da precisão e exatidão . 64
IV - CONCLUSÕES 67
V - RESUMO 71
VI - BIBLIOGRAFIA CITADA 73

I - INTRODUÇÃO

O boro é um elemento que não ocorre livre na natureza (WEAST, SELBY & HOGDMAN, 1964-1965). Na litosfera encontra-se na proporção de 10 ppm (GOLDSCHMIDT, 1954; SWAINE, 1955), porém, segundo Mason (1960), citado por HOGDSON (1963), é de 3 ppm.

Seu conteúdo na água do mar é de 4,0 a 5,0 ppm (GOLDSCHMIDT, 1954) e na água das chuvas varia de 0,02 a 0,04 ppm (MUTO, 1952).

Não se constatou ainda a participação do boro, nem como constituinte e nem como ativador, em qualquer enzima (UNDERWOOD, 1962; SKOL'NIK, 1965). Apesar disso, e também de não se ter nenhuma evidência da sua essencialidade à vida animal (MAYNARD & LOOSLI, 1962; UNDERWOOD, 1962), é essencial aos vegetais superiores.

A necessidade de boro às plantas foi definitivamente aceita após os trabalhos de Warington (1923), Sommer e Lipman (1926) e Sommer (1927), conforme cita BRADFORD (1966). Contudo, pouco se conhece ainda sôbre suas funções na planta. Diversas sugestões existem, tais como as apresentadas por BERGER (1949), baseando-se em trabalhos de diversos autores: o boro é muito importante na divisão celular e é, aparentemente, um componente necessário da parede da célula. Segundo Scripture e McHarque (1945), citados por MALAVOLTA & OUTROS (1967), o boro, aparentemente, desempenha importante papel na translocação dos carboidratos.

O teor de boro nos vegetais é variável, dependendo da espécie, estado nutricional, parte da planta, etc., conforme se pode observar no trabalho de BRADFORD (1966), que compilou dados de numerosos autores em uma grande variedade de vegetais. Os dados mostram que, em plantas normais, pode-se encontrar desde 5,0 até 665 ppm de boro. Ainda êste autor considera, citando Shive (1941), as monocotiledôneas mais pobres em boro do que as dicotiledôneas, sendo os membros das famílias Papilionaceae e Cruciferae especialmente ricas dêsse elemento. Por outro lado, de acôrdo com MALAVOLTA & OUTROS (1967), as leguminosas têm teores de boro mais elevados que as

demais plantas. Entre nós, as plantas que têm mostrado sintomas de deficiência dêsse elemento são o cafeeiro, o repôlho, a couve-flor, os citrus, o tomateiro e o brócoli (BRASIL SOBRº, 1965; MALAVOLTA & OUTROS, 1967).

No solo, o boro ocorre na forma mineral e também constituindo a matéria orgânica. Embora êle seja componente de 56 minerais (BERGER, 1949), nos solos de regiões úmidas, provàvelmente, a turmalina é a principal fonte mineral de boro, sendo que, nos solos áridos, boratos de sódio, potássio e cálcio também concorrem (BERGER & PRATT, 1963).

O teor total de boro no solo pode variar de 20 a 200 ppm (BERGER & PRATT, 1963). Em solos do Estado de São Paulo, BRASIL SOBRº (1965) encontrou de 19 a 150 ppm.

Por outro lado, o teor de boro disponível às plantas, contido na camada arável dos solos, varia de 0,05 a 5,0 ppm nas regiões úmidas, podendo ser consideràvelmente maior nas regiões áridas (BERGER & PRATT, 1963). BRASIL SOBRº (1965) encontrou teores de 0,06 a 0,32 ppm em solos do Estado de São Paulo.

Uma característica bastante importante dêsse elemento, do ponto de vista nutricional, é o pequeno intervalo de concentração em que o boro se mostra adequado ao desenvolvimento das plantas (Blenchley, 1914, citado por BRADFORD, 1966; NAFTEL, 1939; JACKSON, 1958).

Dos métodos colorimétricos de determinação do boro, de uma maneira geral, têm sido preferidos o da curcumina, quinalizarina, ácido carmínico e 1,1-diantramida (PORTER & SHUBERT, 1958). Dêstes, o método da curcumina baseado na técnica de NAFTEL (1939), é o mais sensível, muito embora exija um rígido contrôle de diversos fatôres que influem na sua precisão, notadamente a temperatura do banho de água, onde se processa a evaporação da solução e a formação do complexo colorido (LUKE, 1955; SPICER & STRICKLAND, 1958).

Em 1962, HAYES & METCALFE apresentaram uma nova técnica para a determinação do boro através do reagente curcumina, a qual não exige evaporação sob temperatura contro-

lada, eleva grandemente a sensibilidade do reagente e é relativamente simples e rápida. Fundamenta-se na produção do complexo rosocianina, quando, a um resíduo sêco contendo o ânion borato, se adiciona solução acética de curcumina e solução de ácido sulfúrico-acético (1 + 1).

O presente trabalho tem por finalidade o estudo de diversos aspectos do método colorimétrico de determinação do boro, através dessa nova técnica de uso do reagente curcumina. Assim, foram objetos de estudo a velocidade da reação, influência da temperatura e da umidade, solventes, amplitude, exatidão e precisão, interferentes, etc., assim como a sua aplicação na determinação do boro em vegetais.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dos métodos de determinação do boro atualmente existentes, os de maior uso são os volumétricos, para macro quantidades, e os colorimétricos, para micro quantidades (PORTER & SHUBERT, 1958).

Numerosos são os reagentes que se prestam para a determinação colorimétrica do boro, os quais são relatados por GOWARD & WIEDERKEHR (1963). Êstes autores dividem os reagentes em dois grupos, ou seja, o grupo das antraquinonas e o grupo misto, sendo que o primeiro compreende duas classes: hidroxiantraquinonas e antraquinonilaminas. Os principais reagentes de cada grupo estão descritos no quadro 1.

QUADRO 1 - Principais reagentes para a determinação colorimétrica do boro.

Grupos	Reagentes
Antraquinonas	
a) hidroxiantraquinonas	quinalizarina
	ácido carmínico
	diaminocrisazina
b) antraquinonilaminas	1,1'-diantramida
	5-benzamido-6'-cloro-1,1'-bis
	5-p-toluidino-1,1'-bis
Misto	curcumina
	azul de metileno
	azure A
	azure B
	cloranilato de bário

Todos os reagentes antraquinonas são usados em solução de ácido sulfúrico concentrado, sendo que a concentração do reagente e da solução de ácido sulfúrico afetam a sensibilidade dos mesmos, o que, aliás, ocorre de maneira mais

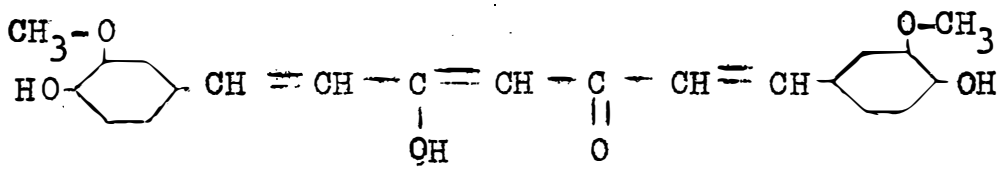
pronunciada na classe das hidroxiantraquinonas (GOWARD & WIEDERKEHR, 1963).

Os reagentes hidroxiantraquinonas, apesar de propiciarem métodos rápidos, apresentam baixa sensibilidade, em consequência da pequena diferença entre a absorbância do reagente e a do complexo formado, no comprimento de onda de máxima absorção do complexo (SPICER & STRICKLAND, 1958).

Os reagentes antraquinonilaminas são os mais sensíveis do grupo das antraquinonas, destacando-se a 1,1'-diantramida (ELLIS, ZOOK & BAUDISCH, 1949; GOWARD & WIEDERKEHR, 1963).

No grupo misto encontram-se os mais sensíveis reagentes colorimétricos para a determinação do boro. Entre êles, destacam-se o azul de metileno e a curcumina. O primeiro é de uso relativamente recente (DUCRET, 1957; PASZTOR, BODE & FERNANDO, 1960), enquanto que a curcumina foi um dos primeiros reagentes propostos para a referida determinação (PORTER & SHUBERT, 1958).

A curcumina é um pigmento amarelo alaranjado que ocorre em raízes de uma espécie de planta do gênero Curcuma. Porém, alguns autores citam Curcuma longa, L. (UPHOF, 1959; THE MERCK INDEX, 1960), enquanto outros citam Curcuma tinctoria (GRIMMEL, 1953; DIBLE, TRUOG & BERGER, 1954; HARPER, 1956). Por outro lado, curcumina pode ser sintetizada, o que foi feito, pela primeira vez, por Lampe, em 1918, conforme relata HARPER(1956). Sua estrutura, hoje conhecida, foi estabelecida por Heller (1914-1917) e Gooch (1919), e confirmada por SPICER & STRICKLAND (1952-a) através de estudos na região do infra-vermelho, a qual está exposta adiante.



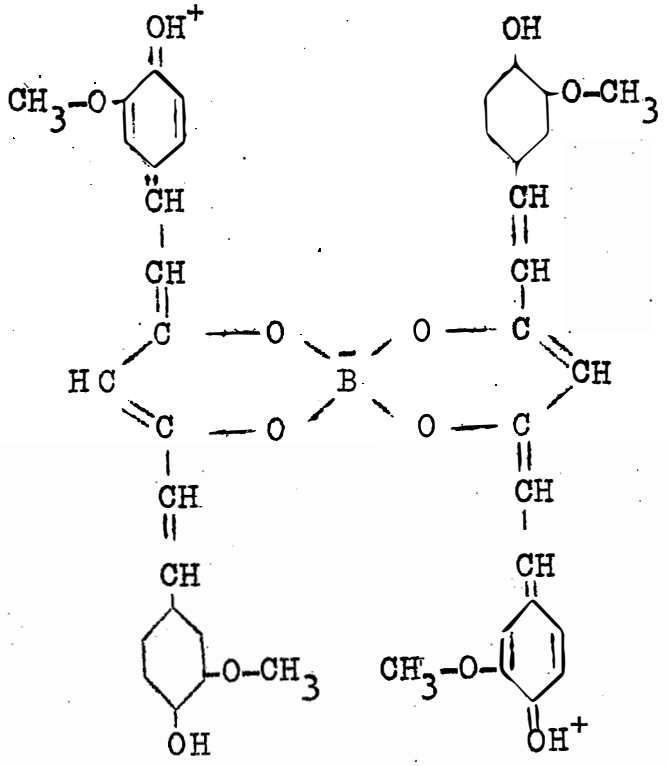
curcumina

O grupo enólico β - dicetônico presente na

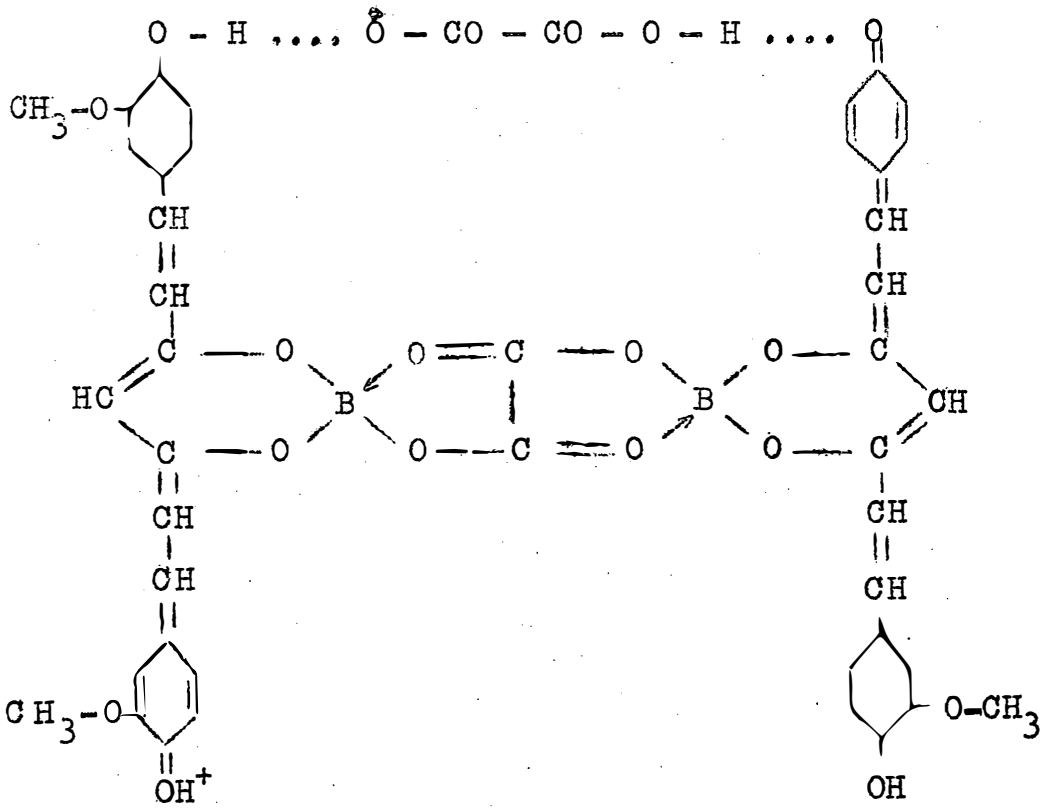
curcumina, ou o grupo amino ($-NH_2$) no lugar da hidroxila, encontra-se, pràticamente, em todos os reativos colorimétricos para boro, devendo, portanto, ser a unidade reativa (Korenman, 1947, citado por SPICER & STRICKLAND, 1952-a e 1958).

A reação entre o ânion borato e a curcumina, apesar de ter merecido atenção desde o século passado (Schlumberger, 1866, citado por SPICER & STRICKLAND, 1952-a e por DIBLE, TRUOG & BERGER, 1954), foi detalhadamente estudada por SPICER & STRICKLAND, em 1952-a e b. Êsses autores mostraram que essa reação pode originar dois complexos, rubrocurcumina e rosocianina, dependendo da natureza do ácido presente. O primeiro complexo forma-se em presença de ácido oxálico e o segundo em presença de ácido mineral.

A despeito dêsses complexos terem sido isolados pela primeira vez e assim denominados por Clarke & Jackson, em 1908, êles acreditavam que os referidos complexos não continham boro, sendo apenas uma forma isomérica da curcumina (SPICER & STRICKLAND, 1952-a, 1952-b e 1958). Em 1952-a e b, SPICER & STRICKLAND estudaram minuciosamente êsses complexos e mostraram que êles contém boro quìmicamente ligado, assim como sugeriram a estrutura de cada um, como estão adiante mostradas.



rosocianina



rubrocurcumina

Como se observa, a rosocianina contém boro e curcumina na relação 1:2, enquanto a rubrocurcumina contém boro, ácido oxálico e curcumina na relação 1:1:1. Consequentemente, do ponto de vista teórico, os métodos que produzem rosocianina devem apresentar o dôbro da sensibilidade dos que produzem rubrocurcumina (SPICER & STRICKLAND, 1952-b e 1958). Contudo, para a rosocianina, HAYES & METCALFE (1962) encontraram a relação boro-curcumina de 1:3, enquanto THIERIG & UMLAND (1965) confirmaram a relação 1:2.

Segundo SPICER & STRICKLAND (1952-b), quando estão presentes ácido oxálico e um ácido mineral, os dois complexos são formados, porém, a produção de rubrocurcumina excede grandemente a de rosocianina quando os dois ácidos se encontram em quantidades equimolares.

Convém salientar também que o ácido oxálico não deve ser o único ácido que possibilita a obtenção de rubrocurcumina. Alguns autores têm usado também o ácido triclo-

roacético (Philipson, 1944, citado por SPICER & STRICKLAND, 1958; LIMA, PAGANO & SCHNEIDERMAN, 1960).

Cassal e Gerrans (1903) foram os primeiros a empregar a curcumina, na determinação colorimétrica do boro, desenvolvendo a reação em solução (BERGER, 1949; DIBLE, TRUOG & BERGER, 1954). Também notaram que o ácido oxálico favorece grandemente a reação entre o ânion borato e a curcumina (SPICER & STRICKLAND, 1958).

Em 1939, NAFTEL tomando por base essa reação e algumas sugestões de Gooch (1887), aperfeiçoou a técnica e desenvolveu um método para a determinação do boro em plantas e solos.

BERGER (1949) considerou êsse método longo e incômodo, principalmente por necessitar de uma evaporação, em banho-maria, com temperatura rigorosamente controlada para o desenvolvimento da reação.

DIBLE, TRUOG & BERGER (1954) simplificaram o método de NAFTEL (1939), eliminando diversas operações de filtração e evaporação. Apesar disso, COGBILL & YOE (1955), LUKE (1955), DUCRET & SEGUIN (1957), LUKE & FLASCHEN (1958) e SPICER & STRICKLAND (1958), apontaram diversos fatôres que devem ser rigorosamente controlados no referido método, a fim de se conseguir boa precisão; assim, a umidade atmosférica, a precipitação de sais durante a evaporação, a pureza da curcumina, e todos os requisitos que podem fazer variar a velocidade de evaporação, como tamanho e forma dos recipientes, temperatura do banho-maria, conteúdo de água nos reagentes, etc., são os fatôres mais citados.

Os métodos baseados na técnica de NAFTEL (1939) produzem os dois complexos, mas rubrocurcumina é o mais abundante (SPICER & STRICKLAND, 1958), visto que tais métodos usam um pouco de ácido mineral (HCl) além do oxálico.

Em 1958, SPICER & STRICKLAND, com base em seus trabalhos anteriores (1952 a e b), desenvolveram um método cujo complexo formado era exclusivamente rosocianina, obtendo assim a máxima sensibilidade até então conseguida para o

reagente curcumina.

Apoiados nesses estudos, HAYES & METCALFE - (1962) apresentaram um método muito sensível, onde se obtém sòmente rosocianina, através de uma técnica simples e rápida. A reação se processa a temperatura ambiente, em meio líquido, - mas não aquoso, porém, fortemente ácido, não necessitando de evaporação sob temperatura controlada. Aplicaram-no em diversos materiais, inclusive orgânicos.

THIERIG & UMLAND (1965), usando a técnica - proposta por HAYES & METCALFE (1962), aperfeiçoaram-na e desenvolveram um método para ser aplicado na determinação do boro - no limite das nanogramas.

Esta revisão bibliográfica é de caráter geral, pois maiores detalhes serão apresentados nos capítulos referentes à parte experimental.

III - PARTE EXPERIMENTAL

Nesta parte serão descritos os estudos desenvolvidos sôbre os diversos fatôres relacionados com a determinação do boro, através do método da curcumina que se baseia na produção de rosocianina em meio líquido fortemente ácido. Serão estudadas as condições que garantem a desprotonação da curcumina, a velocidade da reação, amplitude, exatidão e precisão, solventes, interferentes, etc., assim como a sua aplicação na determinação do boro em vegetais.

1 - Estudo sumário sôbre a desprotonação da curcumina.

A reação entre o ânion borato e a curcumina só ocorre a uma velocidade considerável quando a molécula da curcumina é protonada por um ácido forte (SPICER & STRICKLAND, 1952-a).

Segundo HAYES & METCALFE (1962), a adição de um próton à curcumina processa-se em meio fortemente ácido, sendo que a presença de água ou outro solvente inibe a protonação e, consequentemente, a formação dos complexos boro-curcumina. Consideram que qualquer ácido pode ser usado, desde que a sua constante de ionização exceda a 6×10^{-2}. Verificaram, porém, que a curcumina é protonada, completa e instantâneamente, quando em solução de ácido acético, pela adição de ácido sulfúrico. Ainda, conforme êsses autores, a curcumina protonada, que adquire côr vermelho púrpura, absorve luz no mesmo comprimento de onda da rosocianina; assim, na determinação do boro através da formação dêsse complexo, após a reação ter-se completada, a curcumina deve ser desprotonada, o que se consegue reduzindo a acidez do meio. A diminuição da acidez pode ser feita por diluição com apenas um solvente adequado (HAYES & METCALFE, 1962), ou com um solvente contendo um aceitador de prótons, como o ânion acetato (GRINSTEAD & SNIDER, 1967).

Tendo em vista os estudos a serem realizados sôbre essa reação, usando quantidades variáveis de curcumi

na e de solução de ácido sulfúrico-ácido acético (1 + 1), julgou-se necessário, de início, conhecer as condições que garantem a total desprotonação da cúrcumina nesses diversos meios.

Reativos. Os reativos usados nos experimentos a serem descritos foram os seguintes:

Solução de NaOH a 2%, em água desmineralizada.

Soluções padrões de boro. Foram preparadas a partir de ácido ortobórico (H_3BO_3) p.a., prèviamente sêco em estufa a 50-60ºC, durante 4-5 horas. Solução A, contendo 100 microgramas de boro por mililitro: dissolveu-se 0,5720 g do H_3BO_3 em água desmineralizada e o volume foi completado a 1 litro. Solução B, contendo 25 microgramas de boro por mililitro: transferiram-se 25 ml da solução A para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água desmineralizada. Soluções padrões, contendo 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00 e 2,50 microgramas de boro por mililitro: foram transferidos, por meio de microbureta, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00, 6,00, 8,00 e 10,00 ml da solução B para balões volumétricos de 100 ml e os volumes foram completados com água desmineralizada.

Soluções de curcumina a 0,075%, 0,125% e 0,175%, em ácido acético glacial. Foram dissolvidos, respectivamente, 0,075 g, 0,125 g e 0,175 g de curcumina (Eastman Kodak) em 100 ml de ácido acético glacial p.a. (Merck). Essa dissolução foi feita em copo de plástico e com agitação.

Solução de ácido sulfúrico-ácido acético (1 + 1), [H_2SO_4 - $H_4C_2O_2$ (1 + 1)]. Foram adicionados 50 ml de ácido sulfúrico p.a., d = 1,84 (Baker ou Quimitra), vagarosamente e sob agitação constante, a 50 ml de ácido acético glacial p.a. contido num copo de plástico colocado numa cuba contendo água e gêlo.

Álcool etílico a 85%. Foram transferidos 850 ml de álcool etílico 99,5º G.L. a um balão volumétrico de 1 litro e o volume foi completado com água desmineralizada.

Com exceção do álcool etílico, todos os de-

mais reativos foram guardados em frascos de plástico.

Procedimento.

Foram transferidos 1 ml da solução de NaOH a 2% e 1 ml da solução padrão de boro contendo 0,75 ug/ml, para copos de plástico de 100 ml, sendo, em seguida, colocados em banho-maria até secagem completa. Ao resíduo sêco e frio juntaram-se volumes variáveis das soluções de curcumina e da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), conforme está descrito no quadro 2. Procedeu-se a homogeneização e foram deixados reagir por 15 minutos, após o que, ao conteúdo dos copos foi adicionado álcool etílico a 85%. Foram transferidos para balões volumétricos de diferentes volumes (25, 50 e 100 ml) e, com o mesmo álcool, o volume dos balões foi completado, tomando-se o cuidado de deixar esfriar por alguns minutos, antes de se atingir o volume final. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo D.B., no comprimento de onda de 555 milimicrons, usando célula de 1 centímetro. Deve-se ressaltar que tanto nesse, como nos demais experimentos, os materiais de vidro foram lavados com solução de HCl (1 + 1), conforme recomendam LOTT & OUTROS (1961).

Os resultados obtidos nas diferentes condições estão relatados no quadro 2.

Os dados esclarecem que nas condições 1 e 2 tôdas as diluições efetuadas foram suficientes para desprotonar totalmente a curcumina. Porém, nas demais condições estudadas, isso ocorreu sòmente nas diluições a 50 e 100 ml, pois nas diluições a 25 ml houve acréscimo na absorbância, o que permite supor que ainda há curcumina na forma protonada. Os resultados obtidos nas condições 7, 4 e 8, as diluições a 25 ml mostram o efeito da concentração da solução de curcumina na desprotonação. Finalmente, pode-se observar também, nos dados obtidos nas diluições a 50 e 100 ml, que a absorbância das soluções tendem a diminuir quando se aumenta o volume de solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), fenômeno êsse que se acentua com a diminuição da concentração da solução de curcumina (condição 7).

QUADRO 2 - Relação entre a absorbância e o volume final das soluções contendo o complexo rosocianina, obtido a partir de 0,75 ug de boro, desenvolvendo-se a reação - sob diferentes condições (leituras contra o solvente).

Condição nº	Vol. sol. curcumina (ml)	Conc. sol. curcumina (%)	Vol. sol. H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (ml)	Diluição final		
				25 ml	50 ml	100 ml
				A	A	A
1	2	0,125	2	0,52	0,25	0,13
2	2	0,125	3	0,52	0,25	0,13
3	2	0,125	4	0,54	0,25	0,12
4	2	0,125	5	0,56	0,24	0,12
5	3	0,125	2	0,54	0,26	0,13
6	3	0,175	3	0,61	0,27	0,13
7	2	0,075	5	0,47	0,21	0,10
8	2	0,175	5	0,62	-	-

2 - Estudo da velocidade da reação.

A velocidade de formação da rosocianina através da reação entre o ânion borato e a curcumina em meio acético-sulfúrico, sòmente foi considerada por HAYES & METCALFE (1962), que estudaram apenas a influência do volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Encontraram que, para 1 micrograma de boro contido num resíduo sêco, e 3 ml da solução de curcumina a 0,125%, a reação se completou dentro de 5 minutos usando 2, 3 ou 4 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Recomendaram porém, o uso de 3 ml dessa solução e o tempo de reação de 15 minutos. THIERIG & UMLAND (1965) empregaram essas condições recomendadas, porém, usando o tempo de 20 minutos.

Diversos autores, com o intuito de eliminar a operação de evaporação da solução da amostra, sugerem processos que possibilitam realizar a reação diretamente. Nestas condições, encontram-se os mais variados períodos de tempo adotados para o desenvolvimento da reação. Assim é que, ELWELL &

WOOD (1963), desenvolvendo-a sôbre 10 ml da amostra quando em solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), ou sôbre 0,5 ml quando em solução aquosa, recomendaram 30 minutos.

CRAWLEY (1964), usando 1 ml de solução aquosa da amostra e eliminando a água com anidrido acético antes da adição dos demais reagentes, adotou 5 minutos.

HARRISON & COBB (1966), usando um processo semelhante ao anterior, recomendaram 1 hora.

GRINSTEAD & SNIDER (1967) realizaram a reação em 0,5 ml de solução aquosa da amostra empregando o tempo de reação de 30 minutos até 4 horas, sem apresentar as razões dessa variação.

Observa-se, portanto, que, com exceção de HAYES & METCALFE (1962), os demais autores limitaram-se a recomendar um tempo de reação.

Com o objetivo de se obter alguma informação mais detalhada sôbre êsse assunto, foram conduzidos diversos estudos que, a seguir, estão descritos.

2.1 - Identificação dos fatôres que influem na velocidade da reação.

No presente estudo procurou-se reconhecer os diversos fatôres relacionados com a velocidade da reação. Assim, foram objetos de investigação a quantidade de boro, o volume e a concentração da solução de curcumina, o volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ e a água.

Reativos. Os reativos usados já foram descritos anteriormente.

Procedimento. Será descrito o procedimento geral seguido em todos os experimentos. As particularidades aqui omitidas serão descritas em cada experimento, em virtude de constituirem as variáveis, objeto de estudo. Para copos de plástico de 100 ml foram transferidos 1 ml de solução de NaOH a 2% e 1 ml de solução padrão de boro, sendo, em seguida, colo

cados em banho-maria à ebulição, até secagem completa. Ao resíduo sêco e frio juntaram-se a solução acética de curcumina e a solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Foram homogeneizados e deixados reagir por períodos variáveis, mas determinados, de tempo. Após, ao conteúdo dos copos foi imediatamente juntado álcool etílico a 85%, provocando assim a paralização da reação.- Foram transferidos para balões volumétricos de 50 ml e, com o mesmo álcool, o volume dos balões foi completado, tomando-se o cuidado de deixar esfriar por alguns minutos antes de se atingir o volume final. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 555 milimicrons, usando filtro azul e célula de 1 centímetro.

2.1.1 - Influência da quantidade de boro.

Nesse estudo foram empregadas as seguintes condições: dois padrões de boro (0,25 e 1,25 ug/ml), 2 ml da - solução de curcumina a 0,125%, 1 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e os tempos de reação mostrados no quadro 3, onde também estão descritos os resultados obtidos.

QUADRO 3 - Transmitância das soluções em função do tempo e da quantidade de boro (leituras contra o solvente).

Tempos de reação (minutos)	Quantidades de boro	
	0,25 ug	1,25 ug
	%T	%T
5	86,0	49,0
10	84,0	43,0
12	84,0	42,0
14	83,0	41,0
16	83,0	41,0
18	83,0	41,0

Observa-se, pelos resultados, que a quantidade de boro entre 0,25 e 1,25 microgramas não tem influência sôbre a velocidade da reação, pois, nas duas quantidades usadas a reação se completou em 14 minutos.

2.1.2 - Influência da concentração da solução de curcumina.

Nesse estudo foram usadas as seguintes condições: solução padrão de boro contendo 1,00 ug/ml, 2 ml da solução de curcumina, porém, de duas concentrações (0,125% e 0,175%), 3 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e os tempos de reação mostrados no quadro 4, onde também estão descritos os resultados obtidos.

QUADRO 4 - Transmitância das soluções em função do tempo e da concentração da solução de curcumina (leituras contra o solvente).

Tempos de reação (minutos)	Concentração da solução de curcumina	
	0,125%	0,175%
	%T	%T
5	52,0	49,0
8	49,0	49,0
10	49,0	50,0
12	49,0	49,0
14	49,0	49,0
16	49,0	49,0

Os dados obtidos revelam que o aumento da concentração da solução de curcumina de 0,125% para 0,175% provocou uma aceleração na reação.

2.1.3 - Influência do volume da solução de curcumina.

Nesse estudo foram usadas as seguintes condições: solução padrão de boro contendo 1,00 ug/ml, dois volumes (2 e 3 ml) da solução de curcumina a 0,125%, 3 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e os tempos de reação mostrados no quadro 5, onde também estão descritos os resultados obtidos.

QUADRO 5 - Transmitância das soluções em função do tempo e do volume da solução de curcumina (leituras contra o - solvente).

Tempos de reação (minutos)	Volumes da solução de curcumina	
	2 ml	3 ml
	%T	%T
5	52,0	51,0
8	49,0	50,0
10	49,0	49,0
12	49,0	49,0
14	49,0	49,0
16	49,0	49,0

Êsses resultados mostram que o volume da solução de curcumina também concorre para alterar a velocidade - da reação. Deve-se salientar, porém, que, nas condições experimentais empregadas, o acréscimo no volume da solução de curcumina diminuiu a velocidade da reação.

2.1.4 - Influência do volume da solução de ácido sulfúrico-ácido acético (1 + 1).

Nesse estudo foram usadas as seguintes condições: solução padrão de boro contendo 1,00 ug/ml, 2 ml da solução de curcumina a 0,125%, 2 volumes (1 ml e 3 ml) da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e os tempos de reação mostrados no quadro 6, onde também estão descritos os resultados obtidos.

Como se observa, os dados do quadro 6 demonstram que o volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) também é um fator do qual depende a velocidade da reação, pois aumentando-se o volume dessa solução a velocidade também foi aumentada.

QUADRO 6 - Transmitância das soluções em função do tempo e do volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) (leituras contra o solvente).

Tempos de reação (minutos)	Volumes da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1)	
	1 ml	3 ml
	%T	%T
5	59,0	52,0
8	54,0	49,0
10	51,0	49,0
12	50,0	49,0
14	49,0	49,0
16	49,0	49,0

2.1.5 - Influência da água.

Conforme já foi citado, segundo HAYES & MET CALFE (1962) a curcumina se protona em meio fortemente ácido; a presença de água inibe êsse fenômeno e, consequentemente, a formação dos complexos boro-curcumina.

Êsses autores constataram que, na formação de rosocianina usando o resíduo sêco da amostra, 3 ml de solução acética de curcumina a 0,125%, 3 ml de solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e o tempo de reação de 15 minutos, a adição de até 0,3 ml de água não provocou nenhuma influência. Porém, com a adição de 0,5 ml houve uma queda de 20% na absorbância das soluções e com 1,0 ml caiu 70%. Concluem e recomendam que, para o desenvolvimento da reação diretamente sôbre uma solução aquosa da amostra, as alíquotas desta não devem exceder a 0,25 ml.

Ao lado disso, deve-se associar o fato de participarem dessa reação reagentes altamente higroscópicos, como é o caso do hidróxido de sódio e do ácido sulfúrico.

No entanto, os demais trabalhos sôbre o método em aprêço não apresentam maiores esclarecimentos a respeito. Observa-se apenas que os autores que desenvolvem essa rea

ção diretamente sôbre a solução aquosa da amostra, usando volumes maiores que 0,25 ml, recomendam tempos de reação além de 15 minutos (ELWELL & WOOD, 1963; GRINSTEAD & SNIDER, 1967). Isso leva à suposição de que essa influência esteja relacionada com a velocidade da reação.

Os experimentos adiante descritos foram conduzidos com a finalidade de esclarecer essa suposição.

Nesse estudo foram usadas as seguintes condições: solução padrão de boro contendo 1,00 ug/ml, 2 ml da solução de curcumina a 0,125%, após a qual se adicionou 0,10 ml de água desmineralizada, 2 volumes (1 ml e 3 ml) da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e os tempos de reação mostrados no quadro 7, onde também estão descritos os resultados obtidos.

QUADRO 7 - Transmitância das soluções em função do tempo e do volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), tendo sido adicionado 0,1 ml de água desmineralizada no meio onde se desenvolveu a reação (leituras contra o solvente).

Tempos de reação (minutos)	Volumes da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1)	
	1 ml	3 ml
	%T	%T
5	72,0	55,0
10	63,0	51,0
15	57,0	49,0
20	56,0	49,0
25	54,0	50,0
30	53,0	49,0

Confrontando os dados do quadro 7 com os do quadro 6 (obtidos nas mesmas condições, porém, sem a adição de água), pode-se avaliar a grande influência apresentada pela água sôbre a velocidade da reação.

O quadro 7 também mostra a influência conjunta da água e do volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1),-

sôbre a velocidade da reação, cujos efeitos são opostos. Observa-se que, nas condições estudadas, 1 ml de solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), não foi suficiente para a reação se completar dentro de 30 minutos, ao passo que, usando 3 ml, obteve-se a estabilização das leituras a partir de 15 minutos.

A influência da água sôbre a reação, devido a importância comprovada, será estudada também sob outros ângulos, neste trabalho, futuramente.

2.2 - Estudo conjunto dos fatôres que influem na velocidade da reação.

Conhecidos os fatôres que influem na velocidade da reação, procurou-se agora estudá-los conjuntamente, no intuito de eleger as condições mais adequadas de trabalho para o método em aprêço, em relação a êsses fatôres.

Nesse estudo conjunto, três dos quatro fatôres que afetam a velocidade da reação foram tornados variáveis. Assim, a concentração da solução de curcumina foi estudada em 3 níveis (0,075%, 0,125% e 0,175%), o volume da solução de curcumina em 2 níveis (2 ml e 3 ml) e o volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) em 2 níveis (2 ml e 3 ml).

O fator água foi usado em um único nível, sendo, portanto, constante. Em cada condição estudada foi adicionado 0,2 ml de água desmineralizada. O emprêgo dessa quantidade de água têve por finalidade tornar o método suficientemente tolerante à influência dêsse fator, tendo em vista apenas a higroscopicidade dos reagentes, pois não se pretende desenvolver essa reação diretamente sôbre uma solução aquosa de uma amostra.

Quanto ao tempo da reação, foi de 15 minutos exatos em tôdas as condições estudadas, por considerá-lo satisfatório num método analítico.

Reativos. Os reativos usados já foram descritos anteriormente.

Procedimento. A exemplo do ítem 2.1, tam-

bém será descrito um procedimento geral, estando os detalhes usados em cada condição, mostrados no quadro 8. Para copos de plástico de 100 ml foram transferidos 1 ml de solução de NaOH a 2% e 1 ml da solução padrão de boro contendo 1,00 ug/ml, sendo, em seguida, colocados em banho-maria até secagem completa. Ao resíduo sêco e frio, juntaram-se a solução de curcumina, 0,2 ml de água desmineralizada e a solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Foram homogeneizados e deixados reagir por 15 minutos cada um, após o que, ao conteúdo dos copos foi imediatamente adicionado álcool etílico a 85%. Foram transferidos para balões volumétricos de 50 ml e, com o mesmo álcool, o volume dos balões foi completado, tomando-se o cuidado de deixar esfriar por alguns minutos, antes de se atingir o volume final. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 555 milimicrons, usando filtro azul e célula de 1 cm.

Os resultados obtidos com 2 repetições encontram-se no quadro 8.

Êsses dados demonstram que nas condições de número 1 a 6, a reação não se completou, ao passo que, a partir da condição 7, tôdas foram suficientes para sua realização completa.

Adotou-se, assim, como condição mais conveniente para o desenvolvimento dessa reação, sôbre um resíduo sêco da amostra, 3 ml da solução de curcumina a 0,125%, 2 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e um período de tempo de 15 minutos.

3 - Escolha do comprimento de onda e do filtro.

Com a finalidade de se conhecer o comprimento de onda em que a rosocianina, nas condições estabelecidas no estudo anterior, apresenta máxima absorção de luz, confeccionou-se a curva de absorção dêsse complexo.

Reativos. Os reativos usados já foram descritos anteriormente.

Procedimento. Em copos de plástico de 100

QUADRO 8 - Transmitância das soluções obtidas em condições variáveis de concentração e de volume da solução de curcumina e de volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), sendo a reação desenvolvida em presença de 0,2 ml de água adicionada e durante 15 minutos (leituras contra o solvente).

Condição nº	Vol. sol. curcumina (ml)	Conc. sol. curcumina (%)	Vol. sol. H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (ml)	Transmitância (%T)
1	2	0,075	2	59,0
1	2	0,075	2	59,0
2	2	0,075	3	56,0
2	2	0,075	3	56,0
3	3	0,075	2	56,0
3	3	0,075	2	57,0
4	3	0,075	3	53,0
4	3	0,075	3	53,0
5	2	0,125	2	53,0
5	2	0,125	2	53,0
6	2	0,125	3	51,0
6	2	0,125	3	51,0
7	3	0,125	2	49,0
7	3	0,125	2	49,0
8	3	0,125	3	49,0
8	3	0,125	3	49,0
9	2	0,175	2	49,0
9	2	0,175	2	49,0
10	2	0,175	3	49,0
10	2	0,175	3	49,0
11	3	0,175	2	49,0
11	3	0,175	2	49,0
12	3	0,175	3	48,0
12	3	0,175	3	49,0

ml foram transferidos 1 ml de solução de NaOH a 2%, 1 ml de solução padrão de boro contendo 1 e 2 ug/ml e colocados em banho-

maria à ebulição até secagem completa. Ao resíduo sêco e frio, juntaram-se 3 ml da solução de curcumina a 0,125% e 2 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Foram homogeneizados e deixados reagir por 15 minutos, após o que, ao conteúdo dos copos - juntou-se álcool etílico a 85%. Foram transferidos para balões volumétricos de 50 ml e, com o mesmo álcool, o volume dos balões foi completado, tomando-se o cuidado de deixar esfriar por alguns minutos antes de se atingir o volume final. Para a prova em branco procedeu-se da mesma maneira, usando 1 ml de água desmineralizada em substituição ao padrão de boro.

As curvas de absorção, representadas na figura 1, foram obtidas no espectrofotômetro Beckman, modêlo DB, registrando-se as absorbâncias contra o solvente. Como se observa, a máxima absorção de luz pelo complexo ocorre entre os comprimentos de onda de 538-542 milimicrons.

Em virtude de, em análises de rotina, as - leituras serem feitas em colorímetros, dedicou-se um estudo visando escolher o filtro que oferece maior sensibilidade. O - procedimento seguido foi igual ao já descrito neste capítulo, obtendo-se o complexo nos níveis de 0,00, 0,25, 0,50, 1,00, -- 2,00 e 2,50 ug de boro. As leituras foram feitas no colorímetro Klett-Summerson, empregando-se os filtros nº 52 (485-550 - mu), nº 54 (520-580 mu), nº 55 (520-600 mu) e nº 56 (540-600mu).

Com os dados obtidos, construiram-se as curvas da figura 2, podendo-se concluir que o filtro nº 55 é o - que oferece maior sensibilidade.

4 - Durabilidade dos reagentes.

Não foi encontrada, na literatura consultada, nenhuma referência à respeito da duração da solução acética de curcumina e nem da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). HARRISON & COBB (1966) sòmente afirmam que são estáveis. Torna-se, portanto, necessário um esclarecimento à respeito dêsse assunto.

Nesse estudo foram feitas determinações periódicas, usando sempre de uma mesma solução acética de curcu-

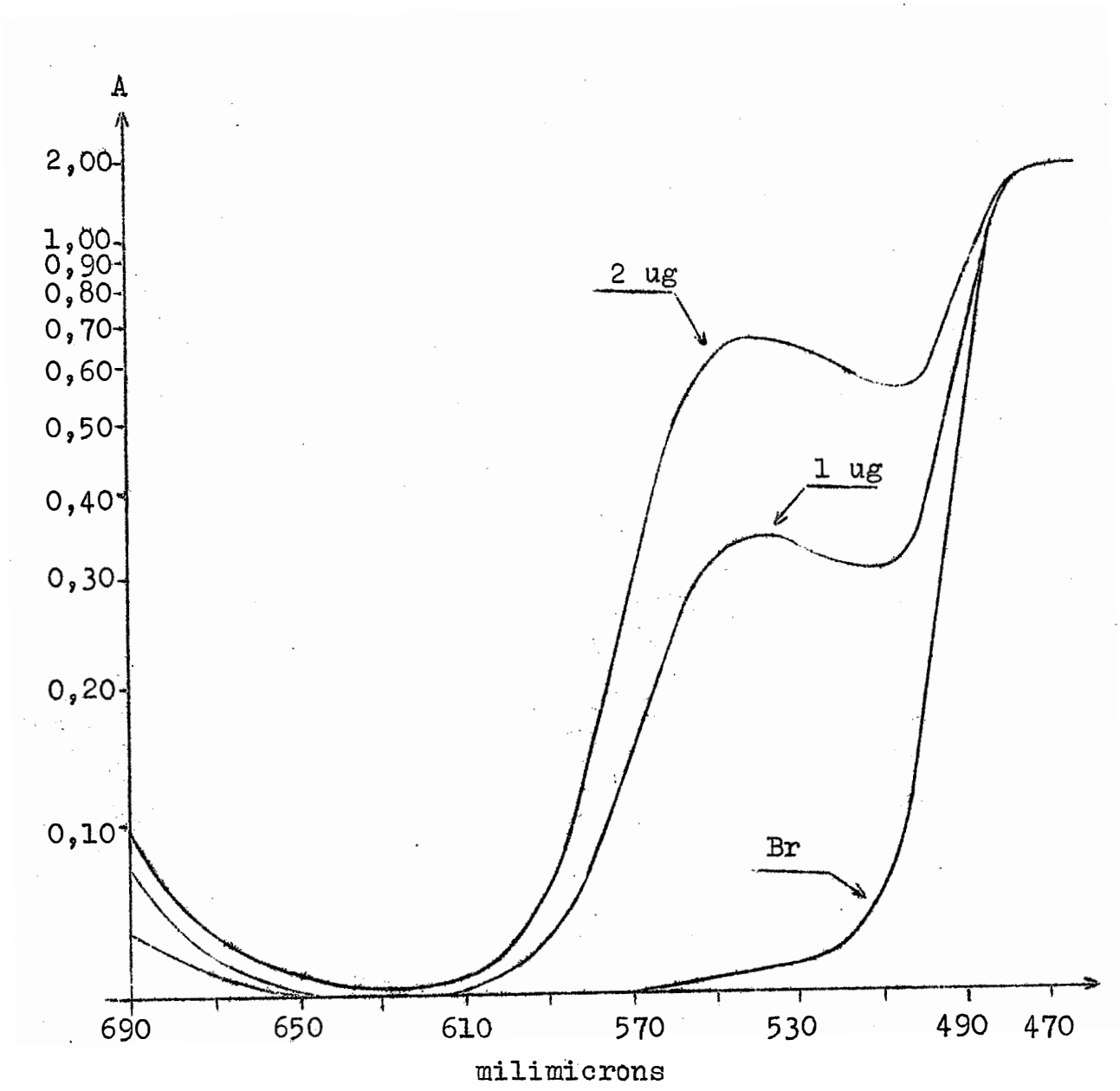


Figura 1 - Espectros de absorção da prova em branco e da rosocianina, obtida com 2 níveis de boro (leituras contra o solvente).

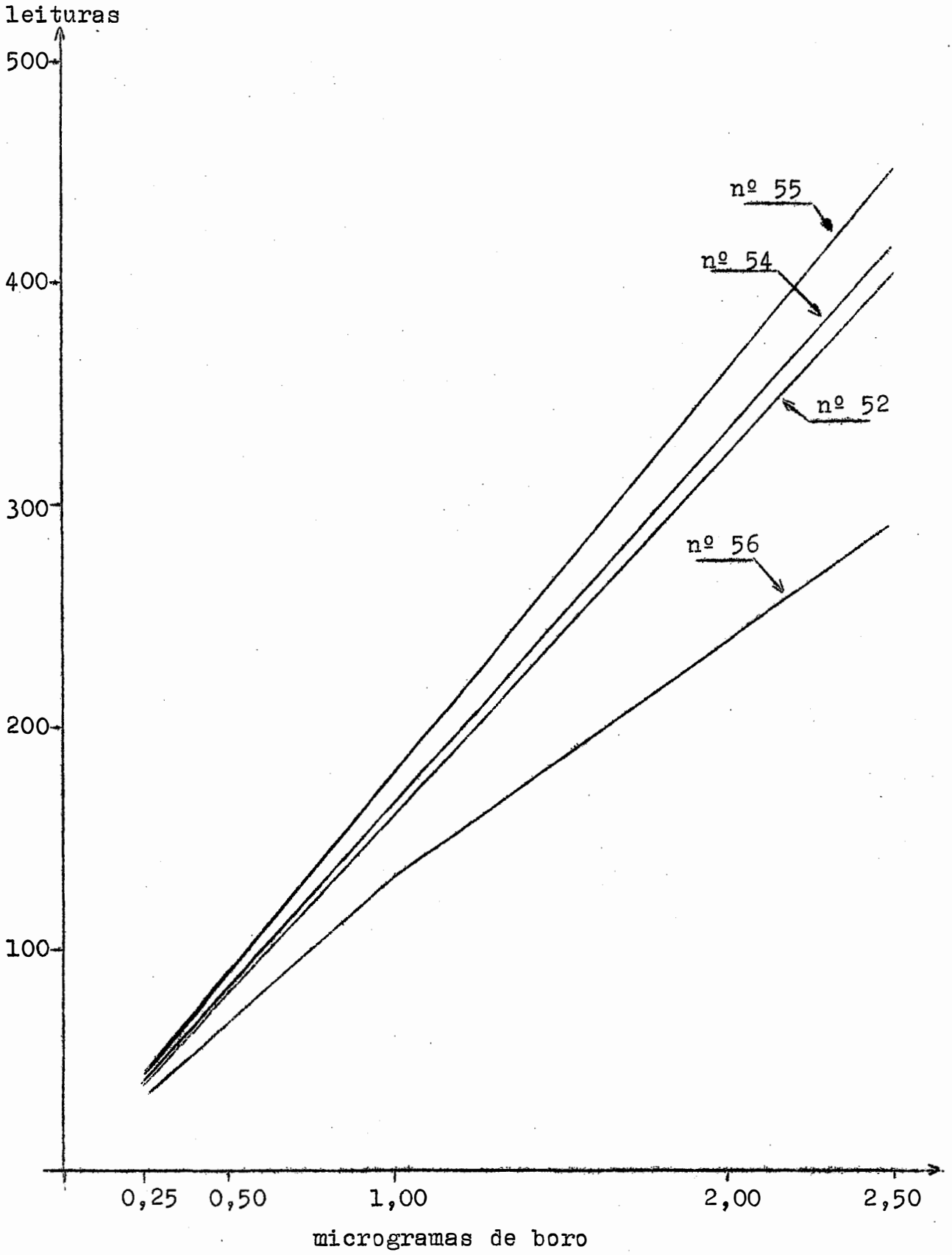


Figura 2 - Relações entre quantidade de boro e absorbância, obtidas no colorímetro Klett-Summerson, com filtros nº - 52, 54, 55 e 56 (leituras contra a prova em branco).

mina e de uma mesma solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), as quais foram conservadas em frascos de plástico e à temperatura ambiente. Em vista da higroscopicidade dessas soluções, os frascos foram deixados abertos diàriamente durante, mais ou menos, 10 minutos, possibilitando assim o aparecimento do efeito da água absorvida. A umidade relativa do ar e a temperatura, anotadas todos os dias, variaram de 37% a 85% e 22ºC a 28,5ºC, respectivamente.

Reativos. Os reativos empregados já foram descritos anteriormente.

Procedimento. O procedimento seguido foi o descrito no ítem 3, fazendo-se as leituras no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 9.

QUADRO 9 - Absorbância das soluções padrões de boro, em relação ao tempo de conservação das soluções de curcumina e de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1).

ug de boro	Tempo de conservação das soluções			
	0 dias	5 dias	10 dias	15 dias
	A	A	A	A
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,32	0,32	0,32	0,32
2,00	0,64	0,65	0,64	0,64

Êsses resultados mostram que as referidas soluções conservam-se perfeitamente, em meio ambiente, durante, pelo menos, 15 dias.

5 - Efeito da água absorvida pelo resíduo sêco e pelas soluções reagentes.

Conforme foi mostrado em 2.1.5, a água apresenta grande influência na reação em foco, o que recomenda bastante cuidado no sentido de evitar a sua participação em quan-

tidade acima da tolerada. Em contraposição, os reagentes dessa reação são higroscópicos, os quais introduzem água no meio. - Dêste ponto de vista, duas são as vias de acesso de água na reação. A primeira, através do resíduo obtido após a secagem no - banho-maria, o qual contém NaOH. A segunda, através das soluções de curcumina e de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), notadamente esta - última. No entanto, é necessário saber se essa água assim introduzida afeta o desenvolvimento da reação.

Para êsse estudo, foi usado ambiente de umidade relativa constante de 90%, onde foram conservados, por períodos variáveis de tempo, o resíduo sêco e as soluções reagentes, possibilitando assim a absorção de água pelos mesmos.

Reativos. Os reativos usados nos experimentos a serem descritos já foram citados anteriormente.

5.1 - Efeito da água absorvida pelo resíduo sêco.

Procedimento. Neste caso o procedimento seguido foi o mesmo descrito no ítem 3, apenas que os resíduos obtidos após secagem no banho-maria, foram colocados no ambiente de 90% de umidade relativa constante e a temperatura ambiente (27ºC), por períodos de tempo variáveis, conforme mostra o quadro 10. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 10.

Deduz-se, portanto, que a água absorvida pelo resíduo sêco, quando conservado até 30 minutos num ambiente com 90% de umidade relativa e a 27ºC, nenhum efeito causou na absorbância das soluções.

5.2 - Efeito da água absorvida pelas soluções reagentes.

Neste caso foram colocados em frascos de - plástico de 60 ml, aproximadamente, 30 ml da solução de curcumina e 20 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1). Os frascos foram tampados, deixados em repouso por, mais ou menos, 1 hora -

QUADRO 10 - Efeito da água absorvida pelo resíduo sêco sôbre a absorbância das soluções padrões de boro (leituras contra as respectivas provas em branco).

ug de boro	Permanência do resíduo no ambiente de umidade (minutos)	Absorbância
0,00	0	0,00
0,00	15	0,00
0,00	30	0,00
1,00	0	0,32
1,00	15	0,32
1,00	30	0,33
2,00	0	0,64
2,00	15	0,65
2,00	30	0,64

e colocados destampados no ambiente de 90% de umidade relativa constante, permanecendo aí, por 5 horas, à temperatura ambiente de 27,5ºC.

Em seguida, foram feitas as determinações - usando êsses reativos, as quais foram repetidas empregando-se reativos não conservados em ambiente de umidade.

Procedimento. O procedimento seguido foi o descrito no ítem 3. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons, estando no quadro 11 os resultados obtidos.

Os dados esclarecem que a água absorvida pelas soluções de curcumina e de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), quando - conservadas por 5 horas num ambiente de 90% de umidade relativa, não afetou a absorbância das soluções.

6 - Estabilidade do complexo nas condições da - reação.

Nas análises de rotina não é conveniente a

QUADRO 11 - Efeito da água absorvida pelas soluções de curcumina e de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) sôbre a absorbância das soluções padrões de boro.

ug de boro	Conservação em ambiente de umidade	Absorbância
0,00		0,00
1,00	sim	0,32
2,00		0,64
0,00		0,00
1,00	não	0,32
2,00		0,64

existência de muitas condições que devam ser rigorosamente obedecidas. Em vista disso e da afirmação de SPICER & STRICKLAND (1952-a), segundo a qual a curcumina protonada se desprotona desde que não tenha permanecido muito tempo naquela forma, julgou-se ser de interêsse saber se uma ampliação no tempo de reação provocaria alguma variação na absorbância das soluções.

Reativos. Os reativos usados já foram citados anteriormente.

Procedimento. O procedimento seguido foi o descrito no ítem 3, com exceção do tempo de reação que foi variável, conforme mostra o quadro 12. Durante o tempo de reação os copos foram conservados em dois ambientes diferentes: no meio ambiente, onde a temperatura foi de 27,5ºC e a umidade relativa do ar foi de 45%, e em ambiente com 90% de umidade relativa constante e 27,5ºC, possibilitando também alguma informação sôbre a influência da umidade. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons e os resultados estão descritos no quadro 12.

Os resultados permitem concluir que o complexo é estável, nas condições da reação, por um período de, pelo menos, 60 minutos.

QUADRO 12 - Efeito da ampliação do tempo de reação, em diferentes ambientes de umidade, sôbre a absorbância das soluções padrões de boro.

ug de boro	Tempo de reação (minutos)	Ambiente	Absorbância (⊕)
0,00	15	45% de umidade relativa e 27,5ºC	0,02
0,00	30		0,02
0,00	60		0,02
1,00	15		0,32
1,00	30		0,32
1,00	60		0,32
0,00	15	90% de umidade relativa e 27,5ºC	0,02
0,00	30		0,02
0,00	60		0,02
1,00	15		0,32
1,00	30		0,32
1,00	60		0,32

(⊕) As provas em branco foram lidas contra o solvente e os padrões contra as respectivas provas em branco.

7 - Influência da temperatura.

HAYES & METCALFE (1962) estudando a influência da temperatura na presente reação, não encontraram qualquer efeito no intervalo de 10 a 30ºC.

THIERIG & UMLAND (1965) recomendam que, em temperaturas extremas, a reação deve ser conduzida num banho de água a 25ºC. Os demais autores que estudaram o método em aprêço, desenvolveram a reação a temperatura ambiente, sem especificações.

Visando esclarecer um pouco mais o assunto, inicialmente foi feito um estudo sôbre a variação que ocorre na temperatura da mistura das soluções reagentes, durante o período de reação. Usando os reativos já mencionados procedeu-se da maneira que vai ser descrita. Obtido o resíduo sêco no banho-maria, esperou-se esfriar e adicionaram-se 3 ml da solução de curcumina. Dissolvido o resíduo, foi mergulhado na so-

lução o bulbo de um termômetro e depois de alguns minutos anotou-se a temperatura. Em seguida, foram adicionados 2 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e a temperatura foi lida em intervalos de 2 minutos durante todo o período de reação. A variação ocorrida está mostrada no quadro 13.

QUADRO 13 - Variação da temperatura da mistura das soluções reagentes, durante o desenvolvimento da reação no meio ambiente (26,5ºC).

Tempo decorrido (minutos)	Temperatura da mistura reagente(ºC)
0	26,5 (temp. ambiente)
2	34,5
4	33,5
6	33,0
8	32,0
10	31,5
12	31,5
14	31,0
16	31,0

Com base nesses dados, foi estudada a influência da temperatura na reação usando os valores 35ºC, 40ºC e 50ºC.

Reativos. Os reativos usados já foram mencionados anteriormente.

Procedimento. Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no ítem 3, apenas que, após a adição da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), os copos foram imediatamente colocados em banho de água a 35ºC, 40ºC e 50ºC, por 30 minutos. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons. Os resultados estão descritos no quadro 14.

QUADRO 14 - Influência da temperatura na reação de formação do complexo rosocianina.

ug de boro	Temperatura		
	35ºC	40ºC	50ºC
	A	A	A
0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,32	0,31	0,22
2,00	0,64	0,63	0,46

Os dados mostram que a 35ºC a absorbância das soluções não sofre variação, enquanto que a 40ºC houve uma pequena diminuição, acentuando-se bem mais a 50ºC. Deve-se salientar, contudo, que todos os experimentos do presente trabalho foram executados à temperatura ambiente, que oscilou de 18ºC a 28ºC, não se constatando nenhuma variação na absorbância das soluções em qualquer temperatura dêsse intervalo. Conclui-se, portanto, que a reação se desenvolve normalmente no intervalo de temperatura compreendido entre 18ºC e 35ºC.

Por outro lado, no método conforme vem sendo empregado, o resíduo sêco obtido no banho-maria dissolve-se relativamente rápido na solução de curcumina. Porém, na aplicação do método prevê-se que a quantidade do resíduo seja bem maior e, consequentemente, talvez haja a necessidade de se aquecer a referida solução para acelerar a dissolução do resíduo.

HATCHER (1960), comparando os processos de digestão de amostras de plantas, por via sêca e por via úmida, visando a determinação do boro, encontrou baixos resultados empregando o processo por via úmida. Sabe-se também que o ácido bórico, em soluções ácidas, se volatiliza fàcilmente quando aquecido (FURMAN, 1962).

Assim, procurou-se verificar se o aquecimento da solução de curcumina, contendo o resíduo, provoca a volatilização do boro ou qualquer outro efeito na determinação em aprêço.

Os reativos empregados já foram citados anteriormente e o procedimento seguido também foi o descrito no ítem 3, apenas que, após a adição da solução de curcumina, os copos foram voltados ao banho, cuja temperatura era de 90ºC, e aí deixados por 3 e 5 minutos. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons e os resultados obtidos encontram-se no quadro 15.

QUADRO 15 - Efeito do aquecimento, em banho de água a 90ºC, empregado para dissolver o resíduo na solução de curcumina.

ug de boro	Tempo de aquecimento (minutos)	Absorbância	
		contra o solvente	contra a prova em branco
0,00	0	0,01	0,00
0,50	0	0,17	0,16
2,00	0	0,66	0,65
0,00	3	0,01	0,00
0,50	3	0,17	0,16
2,00	3	0,66	0,65
0,00	5	0,01	0,00
0,50	5	0,17	0,16
2,00	5	0,65	0,64

Conforme mostram os resultados, houve uma ligeira diminuição na absorbância da solução correspondente a 2,00 microgramas de boro, quando o tempo de aquecimento foi de 5 minutos. Portanto, conclui-se que as soluções podem ser aquecidas por, no máximo, 3 minutos, num banho onde a temperatura não exceda a 90ºC. As absorbâncias contra a prova em branco evidenciam que, dentro dêsse período de 3 minutos, não há necessidade de uniformizar o tempo de aquecimento.

8 - Estudo do solvente e da estabilidade da solução colorida.

Poucos são os solventes usados para diluir

a mistura dos reagentes contendo o complexo, após o término da reação. São empregados o álcool etílico em diversas concentrações, tais como a 90% (FREEGARDE & CARTWRIGHT, 1962), a 85% (SPICER & STRICKLAND, 1958; HAYES & METCALFE, 1962) e a 85% contendo 0,1% de ácido acético glacial (HAYES & METCALFE, 1963), o álcool metílico (ELWELL & WOOD, 1963; CRAWLEY, 1964), e a acetona a 50% em solução aquosa (HARRISON & COBB, 1966). Nenhum dêsses solventes, porém, é citado como sendo, analiticamente, superior. Quanto a estabilidade da solução colorida, apenas HARRISON & COBB (1966) fazem referência: em acetona-água (1 + 1) é estável por 3 horas.

No presente capítulo foram estudados dois dêsses solventes, ou seja, o álcool etílico, em diversas concentrações, e a solução aquosa de acetona (1 + 1), sob os pontos de vista da sensibilidade do método e da estabilidade da solução colorida. O álcool metílico não foi cogitado em virtude de ser quìmicamente semelhante ao etílico e econômicamente desvantajoso.

Reativos. Além dos reativos já citados, foram usados os seguintes:

Soluções aquosas de álcool etílico a 95%, 75%, 60%, 50% e 50% contendo 0,1% de ácido acético glacial.

Solução aquosa de acetona (1 + 1).

Procedimento. O procedimento seguido foi o descrito no ítem 3, para cada solvente estudado. As soluções foram conservadas por um certo tempo, durante o qual, periòdicamente, foram feitas as leituras usando um espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons.

Os resultados encontram-se relatados no quadro 16.

Analisando os dados do quadro 16 quanto a sensibilidade do método, nota-se que, em relação ao solvente álcool etílico, a partir da concentração de 70% há um ligeiro declínio dessa característica com a diminuição da concentração alcoólica. Em acetona-água (1 + 1) pode-se dizer que a sensi-

QUADRO 16 - Absorbância das soluções padrões de boro, em diversos solventes e em função do tempo de conservação da solução colorida (leituras contra o respectivo solvente).

Solvente	ug de boro	Tempo decorrido (minutos)					
		30	45	60	75	90	240
Álcool etílico a 95%	0,00	0,02	-	-	-	-	-
	1,00	0,35	-	-	-	-	-
	2,00	0,67	-	-	-	-	-
Álcool etílico a 85%	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,33
	2,00	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
Álcool etílico a 75%	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,33
	2,00	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,65
Álcool etílico a 70%	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
	2,00	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Álcool etílico a 60%	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
	2,00	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
Álcool etílico a 50%	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
	2,00	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Álcool etílico a 50%, contendo 0,1% de ác. acético glacial	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
	1,00	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
	2,00	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Acetona-água (1 + 1)	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	1,00	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,31
	2,00	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,61

bilidade é inferior do que em álcool etílico a 60%. Quanto a estabilidade da côr da solução, pôde-se constatar que, em to--

dos os solventes estudados, não ocorreu nenhuma variação num período de, pelo menos, 90 minutos. Quando se usou álcool etílico a 95%, decorridos 40 minutos, as soluções começaram apresentar um precipitado cristalino, motivo pelo qual não foram feitas as demais leituras programadas.

Assim, conclui-se que o solvente mais adequado é o álcool etílico em solução aquosa a 75%.

É importante esclarecer que, feita a curva de absorção do complexo usando álcool etílico a 75% como solvente, os resultados encontrados foram idênticos aos obtidos com álcool a 85% (Figura 1). Portanto, o comprimento de onda de máxima absorção de luz é o mesmo.

9 - Estudo da amplitude, precisão e exatidão do método.

HAYES & METCALFE (1962), empregando a técnica de RINGBON (1939), encontraram que o método da curcumina de determinação do boro, baseado na formação de rosocianina em meio acético-sulfúrico, apresenta menor êrro no intervalo de 1,2 a 7,0 microgramas de boro em 100 ml de solução. Porém, FREEGARDE & CARTWRIGHT (1962) trabalharam na amplitude de 0,3 a 1,5 microgramas por 100 ml de solução, enquanto CRAWLEY (1964) considerou o limite mínimo de 0,05 micrograma por 100 ml de solução. Usando um processo de separação do complexo formado, HAYES & METCALFE (1962 e 1963), conseguiram a amplitude ótima de 0,01 a 0,15 micrograma por 10 ml de solução.

9.1 - Amplitude e exatidão.

A partir das conclusões tiradas nos estudos anteriores, sôbre as condições mais adequadas de uso do método em aprêço, procedeu-se a avaliação da amplitude de concentração de boro em que o mesmo apresenta menor êrro. Êsse estudo foi feito empregando-se a técnica de RINGBOM (1939), descrita também por AYRES (1949), e já aplicada em diversos trabalhos semelhantes (BITTENCOURT, 1965; JACINTHO, 1967; GLÓRIA, 1968).

Reativos. Os reativos usados e que ainda não foram citados são os seguintes:

Soluções padrões de boro contendo 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 5,00, 7,50 e 10,00 microgramas de boro por mililitro, em água desmineralizada.

Procedimento. O procedimento seguido foi o descrito no ítem 3, porém, fazendo-se a diluição da mistura das soluções reagentes, contendo o complexo formado, em álcool etílico a 75%, e as leituras no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons, com filtro azul e célula de 1 centímetro.

Aplicou-se a equação de RINGBOM (1939) aos dados obtidos, calculando-se o êrro relativo em diversos intervalos de concentração, considerando-se o êrro fotométrico absoluto de 1%.

$$E = \frac{230}{dT}$$

E = êrro relativo da concentração, em função do êrro fotométrico absoluto de 1%.

dT = variação na porcentagem de transmissão, quando as concentrações variam de 10 vêzes.

Os resultados acham-se no quadro 17.

Conforme mostram os dados do quadro 17, o intervalo de menor êrro relativo da concentração, a 540 milimicrons, foi obtido na amplitude de 0,25 a 5,00 microgramas de boro em 50 ml de solução. Esta é, portanto, a melhor amplitude de concentração de boro para o referido método, quando usado nas condições estudadas.

9.2 - Precisão.

Empregando soluções padrões de boro procurou-se agora observar a reprodutibilidade do método, fazendo as determinações com 5 repetições.

Os reativos usados já foram descritos ante-

QUADRO 17 - Variação do êrro relativo da concentração, quando se considera o êrro fotométrico absoluto de 1%, para diferentes amplitudes de concentração de boro e no comprimento de onda de 540 milimicrons.

Amplitude de concentraçao (ug de boro em 50 ml de solução)	% de êrro relativo da concentração em função do êrro fotométrico de 1%
0,05 a 0,50	9,02
0,10 a 1,00	5,11
0,15 a 1,50	4,22
0,20 a 2,00	3,65
0,25 a 2,50	3,43
0,50 a 5,00	3,43
0,75 a 7,50	4,00
1,00 a 10,00	4,79

riormente e o procedimento seguido foi o descrito no ítem 9.1. Os resultados estão mostrados no quadro 18.

QUADRO 18 - Estudo da precisão do método através da variação na absorbância das soluções padrões de boro (5 repetições).

ug de boro	Absorbância (5 repetições)
0,00	0,00 ± 0,00
0,25	0,08 ± 0,00
0,50	0,16 ± 0,00
1,00	0,32 ± 0,00
2,00	0,64 ± 0,00
2,50	0,80 ± 0,00

De acôrdo com os resultados obtidos, pode-se considerar o método preciso, quando desenvolvido em soluções puras.

Com êsses dados construiu-se a curva repre-

sentada na figura 3, onde está evidente a linearidade apresentada pela relação entre a quantidade de boro e a absorbância. Essa relação linear é observada em todo o intervalo de menor - êrro relativo da concentração, ou seja, de 0,25 a 5,00 microgramas de boro por 50 ml de solução, visto que a absorbância - correspondente a 5,00 microgramas de boro é de 1,61.

10 - Estudo da adsorção do complexo pelas fibras do papel de filtro.

Tendo em vista a possibilidade da retenção do complexo colorido pelas fibras do papel de filtro e prevendo-se a necessidade de filtração da solução final, desejou-se saber se essa operação provoca alguma variação na absorbância das soluções.

Usando-se os reativos já citados, obteve-se o complexo em diversos níveis de boro, procedendo-se como descrito no ítem 9.1. Porém, antes de serem feitas as leituras, parte de cada solução colorida foi passada por papel de filtro Whatman nº 1. A absorbância das partes filtrada e não filtrada, de cada solução, está relatada no quadro 19.

QUADRO 19 - Efeito da filtração sôbre a absorbância das soluções padrões de boro.

ug de boro	Absorbância	
	Parte não filtrada	Parte filtrada
0,00	0,00	0,00
0,25	0,08	0,08
0,50	0,16	0,16
1,00	0,32	0,32
2,50	0,80	0,80

Como se pode observar, a filtração não provocou qualquer variação na absorbância das soluções, permitindo concluir que as fibras do papel Whatman nº 1 não adsorvem - o complexo rosocianina.

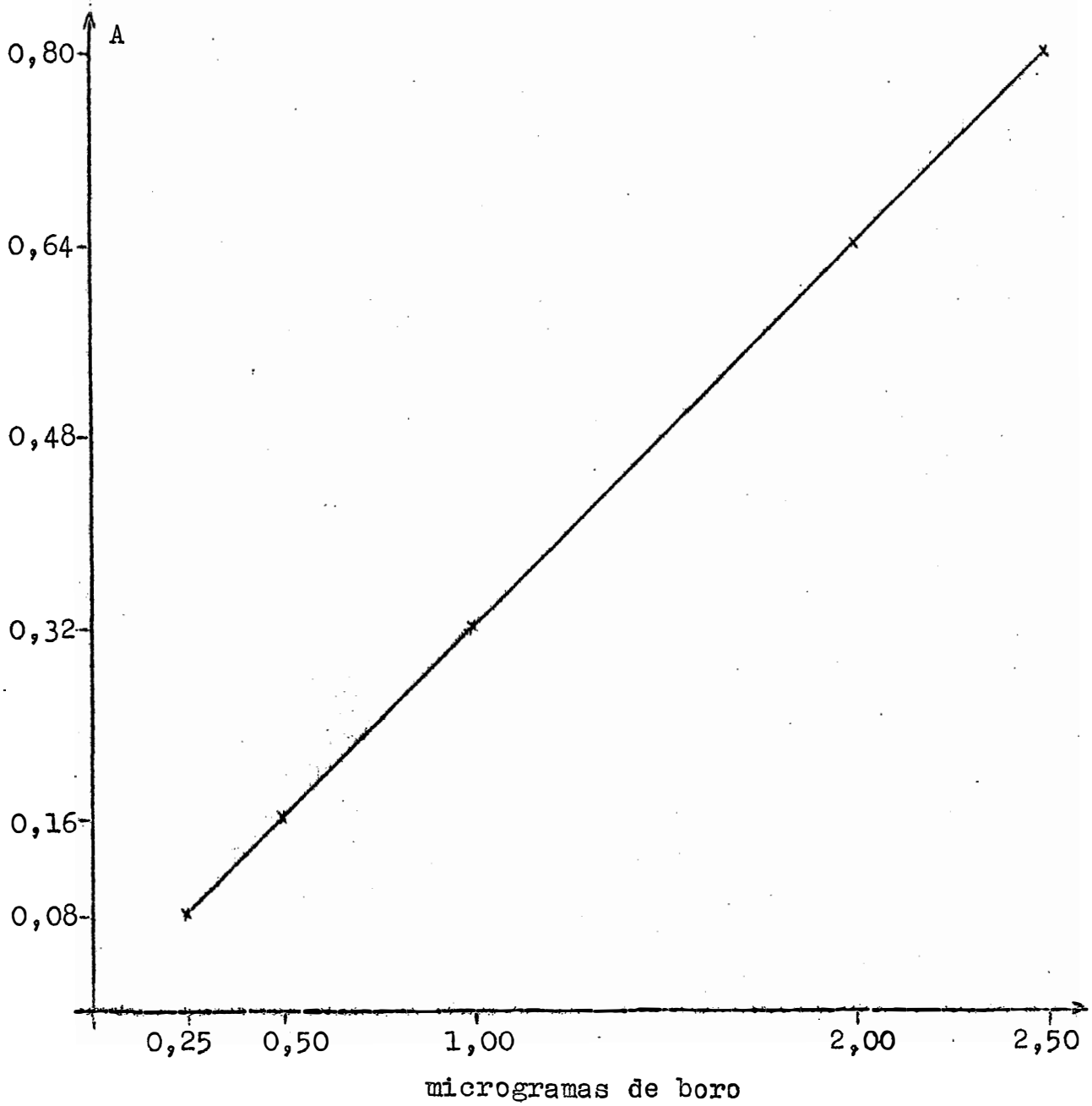


Figura 3 - Relação entre quantidade de boro e absorbância, obtida no espectrofotômetro Beckman, modêlo B, a 540 milimicrons.

11 - Estudo dos interferentes.

Dentre os elementos referidos na literatura como interferentes nos métodos que empregam a curcumina para a determinação de boro, serão considerados apenas aqueles relacionados com o método estudado no presente trabalho e que são encontrados em vegetais.

DIBLE, TRUOG & BERGER (1954), citando Feigl (1937), relatam que, em solução ácida, o cátion férrico e o molibdênio dão uma côr pardo-avermelhada com a curcumina. Ainda êsses autores descrevem que, de acôrdo com Yoe e Sarver (1941), alumínio, ferro e magnésio dão uma côr roxa com o referido reagente, mas que, segundo Kolthoff (1927), isso só ocorre em meio alcalino.

LUKE (1955) considera que, devido a pouca especificidade da curcumina, o boro deve ser separado de outros elementos antes da determinação.

Para SPICER & STRICKLAND (1958) o único elemento que se conhece formar com a curcumina uma substância análoga à rosocianina ou rubrocurcumina é o germânio. Assim, afirmam que os demais interferentes agem ou por complexação do boro ou por destruição da curcumina através da oxidação. Citam ainda que a presença de sais reduz a produção do complexo colorido e também recomendam a separação do boro antes de ser determinado, pois assim não há problemas com interferentes.

Porém, HAYES & METCALFE (1962) não constataram interferência do magnésio, alumínio, sódio, potássio, cálcio, zinco, fosfato e cloreto, usando-os na quantidade de até 10 mg. Também descrevem que a queima de material orgânico de natureza silicosa produz um resíduo que, sendo insolúvel nos reativos usados para a formação da côr, causam interferência por retenção de boro.

FREEGARDE & CARTWRIGHT (1962) adotam também a separação prévia do boro na determinação de pequenas quantidades dêsse elemento, quando em presença de outros elementos em macro quantidades.

COWARD & WIEDERKEHR (1963) referem-se ao

reagente curcumina como sujeito a inúmeros interferentes, sendo, invariàvelmente, necessária a completa separação do boro antes da formação do complexo.

HARRISON & COBB (1966) trabalhando com 0,8 mg de manganês, 0,4 mg de molibdênio, cobalto e silício e 0,2 mg de fósforo, magnésio e zinco não encontraram influência de nenhum dêsses elementos.

Deve-se considerar também que a maioria dos autores citados fazem referência ao nitrato, o qual apresenta influência em quantidade bastante baixa, como 20 microgramas.- Contudo, apesar dêsse ânion estar presente em material vegetal, na incineração da amostra ocorre sua destruição, não ocasionando, portanto, problema na determinação.

11.1 - Reconhecimento dos interferentes.

Como se observa, pela bibliografia anteriormente citada, a questão dos interferentes no método da curcumina de determinação do boro não está bem esclarecida.

Em face disso, nos experimentos adiante descritos, pràticamente todos os elementos encontrados em cinzas de vegetais foram abordados quanto a possibilidade de interferirem no método em aprêço.

Reativos. Os reativos usados nesses experimentos já foram citados anteriormente, com exceção das soluções dos íons cuja influência foi o objeto de estudo. Foram preparadas diversas soluções de cada íon estudado, de várias concentrações, as quais serão consideradas adiante.

Procedimento. O procedimento seguido em todos os experimentos sôbre a influência dos interferentes foi o seguinte: para copos de plástico de 100 ml foram transferidos 1 ml de solução de NaOH a 2%, 1 ml de solução padrão de boro e 1 ml da solução contendo o íon cuja interferência deveria ser estudada. Em seguida, os copos foram colocados em banho-maria até secagem completa. Daqui por diante procedeu-se da mesma maneira como descrita no ítem 9.1. Na prova em branco substi-

tuiu-se o padrão de boro por 1 ml de água desmineralizada e a solução do íon estudado por 1 ml do solvente empregado na mesma.

11.1.1 - Fosfato.

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 1, 4 e 8 mg de P por mililitro, em água desmineralizada e a partir de KH_2PO_4 p.a.. Os resultados encontrados estão relacionados no quadro 20.

QUADRO 20 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de fósforo.

ug de boro	mg de P adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	1	0,16
0,50	4	0,16
0,50	8	0,16
2,00	0	0,64
2,00	1	0,64
2,00	4	0,64
2,00	8	0,64

Os dados do quadro 20 revelam que as quantidades de fósforo estudadas não influiram na determinação do boro. É interessante acrescentar que tal estudo foi feito também ao nível de 16 mg de fósforo, constatando que essa quantidade provocou um pequeno decréscimo na absorbância correspondente a 2,00 ug de boro e não na correspondente a 0,50 ug de boro. Contudo, levando-se em conta o teor de fósforo contido nos vegetais, êsse fato não foi considerado em maiores detalhes.

11.1.2 - Potássio (K^+).

Foram preparadas três soluções contendo,

respectivamente, 5, 25 e 50 mg de K^+ por mililitro, em água desmineralizada e a partir de KCl p.a.. Os resultados encontram-se no quadro 21.

QUADRO 21 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de potássio (K^+).

ug de boro	mg de K^+ adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	5	0,16
0,50	25	0,16
0,50	50	0,16
2,00	0	0,65
2,00	5	0,65
2,00	25	0,65
2,00	50	0,65

Observa-se, portanto, que o cátion K^+ não interferiu na determinação, mesmo estando presente na quantidade de 50 mg. Deve-se esclarecer que, as soluções finais das determinações em presença de 25 e 50 mg de K^+ apresentaram um resíduo que se decantou fàcilmente, não turvando a solução. A leitura dessas soluções foi feita transferindo-se parte do sobrenadante para a cubeta.

11.1.3 - Cálcio (Ca^{2+}).

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 1, 5 e 10 mg de Ca^{2+}, por mililitro, em água desmineralizada, a partir de uma solução estoque de Ca^{2+} constituida de $CaCl.6H_2O$ p.a.; o conteúdo de Ca^{2+} dessa solução foi determinado por quelatometria. Os resultados obtidos estão no quadro 22.

Os resultados revelam que, tanto nas determinações em branco como nos padrões de 0,50 microgramas de boro, tôdas as quantidades de cálcio adicionadas interferiram li

QUADRO 22 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de cálcio (Ca^{2+}).

ug de boro	mg de Ca^{2+} adicionados	Absorbância (⊕)
0,00	0	0,02
0,00	1	0,03
0,00	5	0,03
0,00	10	0,03
0,50	0	0,16
0,50	1	0,17
0,50	5	0,17
0,50	10	0,18
2,00	0	0,65
2,00	1	0,65
2,00	5	0,65
2,00	10	0,65

(⊕) As provas em branco foram lidas contra o solvente, enquanto que as determinações com os padrões foram lidas contra a prova em branco que não recebeu Ca^{2+}.

geira e positivamente, ao passo que nenhuma variação ocasionaram nas determinações sôbre os padrões de 2,00 microgramas de boro.

Em tôdas as determinações que receberam cálcio, após a secagem no banho-maria, o resíduo não se dissolveu na solução de curcumina, permanecendo insolúvel até na solução final, turvando-a. Antes das leituras essas soluções foram filtradas por papel Whatman nº 1.

11.1.4 - Magnésio (Mg^{2+}).

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 1, 5 e 10 mg de Mg^{2+}, por mililitro, em água desmineralizada, a partir de uma solução estoque de Mg^{2+} constituida de $MgCl_2.6H_2O$ p.a.; o conteúdo de Mg^{2+} dessa solução foi determinado por quelatometria. Os resultados obtidos es--

tão descritos no quadro 23.

QUADRO 23 - Resultados das determinações do boro em presença - de diversas quantidades de magnésio (Mg^{2+}).

ug de boro	mg de Mg^{2+} adicionados	Absorbância (⊕)
0,00	0	0,01
0,00	1	0,02
0,00	5	0,02
0,00	10	0,02
0,50	0	0,16
0,50	1	0,17
0,50	5	0,17
0,50	10	0,17
2,00	0	0,65
2,00	1	0,65
2,00	5	0,65
2,00	10	0,65

(⊕) As provas em branco foram lidas contra o solvente, enquanto que as determinações com os padrões foram lidas contra a prova em branco que não recebeu magnésio.

Como se observa, os resultados do quadro 23 são comparáveis aos obtidos no estudo da interferência do cálcio, descritos no quadro 22. Tôdas as quantidades de magnésio estudadas também influiram ligeiramente nas determinações da - prova em branco e nos padrões de 0,50 microgramas de boro. Porém, não foi constatada nenhuma influência nas determinações - com os padrões de 2,00 microgramas.

É necessário relatar ainda que, em tôdas as determinações na presença de magnésio, o resíduo sêco, obtido no banho-maria, não se desprendeu do copo com a adição da solução de curcumina, sendo necessário, para isso, voltar os copos ao banho por alguns segundos. Também as referidas determina-- ções apresentaram um resíduo na solução final, o qual se decantou fàcilmente, sem turvar a solução. A leitura dessas solu--

ções foi feita transferindo-se parte do sobrenadante para a cubeta.

11.1.5 - Cobre (Cu^{2+}).

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 10, 50 e 100 microgramas de Cu^{2+} por mililitro, em água desmineralizada e a partir de $CuSO_4.5H_2O$ p.a.. Os resultados acham-se no quadro 24.

QUADRO 24 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de cobre (Cu^{2+}).

ug de boro	ug de Cu^{2+} adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	10	0,16
0,50	50	0,16
0,50	100	0,16
2,00	0	0,65
2,00	10	0,65
2,00	50	0,65
2,00	100	0,65

Conclui-se, face aos dados obtidos, que a determinação do boro, pelo presente método, pode ser conduzida em presença de até 100 microgramas de cobre, sem ser afetada.

11.1.6 - Zinco (Zn^{2+}).

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 50, 250 e 500 microgramas de Zn^{2+}, por mililitro, em água desmineralizada e a partir de $ZnSO_4.7H_2O$ p.a.. Os resultados obtidos estão descritos no quadro 25.

Êsses resultados permitem afirmar que o cátion Zn^{2+}, na quantidade de até 500 microgramas, não interfere na determinação do boro pelo método em estudo.

QUADRO 25 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de zinco (Zn^{2+}).

ug de boro	ug de Zn^{2+} adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	50	0,16
0,50	250	0,16
0,50	500	0,16
2,00	0	0,65
2,00	50	0,65
2,00	250	0,65
2,00	500	0,65

11.1.7 - Ferro (Fe^{3+}).

Foram preparadas três soluções contendo, respectivamente, 100, 500 e 1000 microgramas de Fe^{3+}, por mililitro, em solução 0,1 N de HCl, a partir de uma solução estoque de Fe^{3+} constituida de $FeCl_3.6H_2O$ p.a.; o conteúdo de Fe^{3+} dessa solução foi determinado por dicromatometria. Os resultados obtidos estão no quadro 26.

O quadro 26 mostra que o cátion Fe^{3+} interfere de uma maneira acentuada e positiva no método em aprêço. Nas determinações onde êsse íon se fêz presente, a solução final apresentou um enegrecimento proporcional a quantidade de Fe^{3+} adicionada. Êsse enegrecimento é referido por HAYES & METCALFE (1962) como consequência da oxidação da curcumina.

Deve-se frisar que os resíduos, obtidos no banho-maria, contendo 1000 microgramas de Fe^{3+} não se desprenderam do copo pela simples adição da solução de curcumina, sendo necessário, para isso, aquecer os copos no banho por alguns segundos. Também os resíduos contendo 500 e 1000 microgramas de Fe^{3+} não foram dissolvidos pela solução de curcumina. Porém, nenhuma das soluções finais apresentaram qualquer resíduo.

QUADRO 26 - Resultados das determinações do boro em presença - de diversas quantidades de ferro (Fe^{3+}).

ug de boro	ug de Fe^{3+} adicionados	Absorbância (⊕)
0,00	0	0,01
0,00	100	0,03
0,00	500	0,06
0,00	1000	0,10
0,50	0	0,16
0,50	100	0,18
0,50	500	0,21
0,50	1000	0,25
2,00	0	0,65
2,00	100	0,66
2,00	500	0,69
2,00	1000	0,68

(⊕) As provas em branco foram lidas contra o solvente, enquanto que as determinações com os padrões foram lidas contra a prova em branco que não recebeu ferro.

11.1.8 - Molibdênio.

Foram preparadas três soluções contendo, - respectivamente, 10, 50 e 100 microgramas de Mo por mililitro, em água desmineralizada e a partir de $Na_2MoO_4.2H_2O$ p.a.. Os - resultados estão mostrados no quadro 27.

Os resultados do quadro 27 revelam que a - presença de molibdênio, na quantidade de até 100 microgramas,- não interfere na presente determinação, apesar de se ter observado que a solução de curcumina, ao entrar em contato com o resíduo sêco contendo molibdênio, têve sua côr amarela intensificada.

11.1.9 - Manganês (Mn^{2+}) e cobalto (Co^{2+}).

Para cada cátion foram preparadas três solu

QUADRO 27 - Resultados das determinações do boro em presença - de diversas quantidades de molibdênio (Mo).

ug de boro	ug de Mo adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	10	0,16
0,50	50	0,16
0,50	100	0,16
2,00	0	0,64
2,00	10	0,65
2,00	50	0,64
2,00	100	0,64

ções contendo, respectivamente, 20, 100 e 200 microgramas do - cátion por mililitro, em água desmineralizada e a partir de - $MnSO_4.H_2O$ p.a. e de $CoCl_2.6H_2O$ p.a.. No entanto, tôdas as determinações em presença tanto de Mn^{2+} como de Co^{2+} não puderam ser completadas, pois, após a adição da solução de curcumina - sôbre o resíduo obtido no banho-maria, parte dêsse resíduo permaneceu insolúvel e aderente ao copo, dêle não se soltando nem sob aquecimento no banho.

11.1.10 - Alumínio (Al^{3+}).

Foram preparadas três soluções contendo, - respectivamente, 50, 250 e 500 microgramas de Al^{3+} por mililitro, em solução de HCl 0,1 N e a partir de $KAl(SO_4)_2.12H_2O$ p.a.. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 28.

Os dados do quadro 28 evidenciam que o cátion Al^{3+} também não influi nesta determinação, dentro dos limites estudados.

Assim, conclui-se que, dos elementos encontrados nas cinzas de vegetais, os que influem no presente método da curcumina de determinação de boro são o cálcio (Ca^{2+}), o magnésio (Mg^{2+}) e mais acentuadamente o ferro (Fe^{3+}), o manga-

nês (Mn^{2+}) e o cobalto (Co^{2+}). Quanto a interferência da sílica, esta será estudada adiante empregando materiais vegetais altamente silicosos.

QUADRO 28 - Resultados das determinações do boro em presença de diversas quantidades de alumínio (Al^{3+}).

ug de boro	ug de Al^{3+} adicionados	Absorbância
0,00	0	0,00
0,50	0	0,16
0,50	50	0,16
0,50	250	0,16
0,50	500	0,16
2,00	0	0,64
2,00	50	0,64
2,00	250	0,64
2,00	500	0,64

11.2 - Eliminação dos interferentes.

Em virtude de todos os interferentes serem cátions, tentou-se resolver êsse problema eliminando-os da solução através do uso de resina catiônica.

A técnica do emprêgo de resina trocadora de cátions, na separação dêstes íons contidos em extratos de material vegetal, foi estudada por GLÓRIA & VITTI (1968), a qual foi utilizada neste trabalho.

11.2.1 - Comportamento do ânion borato na resina trocadora de cátions.

No estudo da separação dos cátions através de resina catiônica, a preocupação inicial consistiu em saber se a resina tem alguma influência sôbre o ânion borato, principalmente quanto a possibilidade da sua retenção. Com êsse objetivo foram conduzidos os experimentos adiante descritos, onde diversas soluções padrões de boro foram passadas pelas colu

nas de resina, procedendo-se no eluido, a determinação do conteúdo de boro.

Reativos. Dos reativos usados, ainda não foram citados os seguintes:

Soluções padrões de boro contendo, respectivamente, 2,50, 5,00 e 10,00 microgramas por mililitro, em solução 0,05 N de HCl.

Resina de troca iônica DOWEX 50W-X8 (50-100 mesh), na forma iônica H^+, com capacidade total de troca de cátions de 5,4 e.mg por grama de resina sêca.

Solução de HCl 4 N, destilado.

Procedimento.

Preparo das colunas de resina. As colunas foram preparadas utilizando um sistema percolador de vidro constituido de um tubo de 135 mm de altura e 5 mm de diâmetro interno, possuindo na parte inferior uma torneira de rôlha esmerilhada (do tipo de bureta), para contrôle da vasão do líquido percolado e na parte superior um depósito de, aproximadamente, 75 ml. Para evitar a passagem de resina pela rôlha esmerilhada, sôbre esta foi colocada uma pequena porção de algodão, no fundo do tubo.

Foram pesados 2,000 g da resina, colocados em suspensão em água desmineralizada e transferidos para o sistema percolador, após o que foi colocada outra porção de algodão sôbre a resina. Êsse sistema, assim preparado, dá uma vasão de, aproximadamente, 2 ml por minuto. A regeneração da resina (eluição dos cátions retidos) foi feita lavando-a com 3 a 4 porções de 5 ml de solução 4 N de HCl destilado, seguida de 3 a 4 porções de água desmineralizada.

Experimento. Foram passados 5 ml das soluções padrões de boro pelas colunas de resina, as quais foram, em seguida, lavadas com 3 porções de 5 ml de água desmineralizada, recebendo-se os eluidos em balões volumétricos de 25 ml. Terminadas as lavagens, o volume dos balões foi completado e o

conteúdo de boro dessas soluções foi determinado, conforme descrito no ítem 9.1, sôbre uma alíquota de 1 ml. Para a prova em branco procedeu-se de maneira idêntica, usando solução 0,05 N de HCl em lugar do padrão de boro. Os resultados obtidos estão no quadro 29.

QUADRO 29 - Resultados da determinação do boro em soluções padrões, após terem sido passadas pela resina catiônica.

ug de boro passados na resina	ug de boro determinados
0,00	0,00
12,50	12,50
25,00	25,00
50,00	50,63

Êsses dados mostram que, conforme era esperado, a resina catiônica não exerce qualquer influência sôbre o ânion borato.

11.2.2 - Separação dos cátions interferentes.

A retenção de cátions pela resina catiônica envolve diversos fatôres, entre os quais o pH da solução e a seletividade da resina (J.T. BAKER CHEMICAL Co., 1958). Considerando que, na determinação do boro em extratos de plantas, os cátions interferentes estarão sempre juntos de numerosos outros cátions, a eficiência da resina, na separação dos interferentes, foi avaliada usando uma solução contendo todos os cátions normalmente encontrados em cinzas vegetais.

Reativos. Dos reativos empregados merecem menção os seguintes:

Solução equivalente a um extrato de vegetal, em relação aos cátions. Foi preparada uma solução correspondente ao extrato de um vegetal, supondo-o conter elevado teor de cada um de seus cátions, conforme dados de CHAPMAN (1966), citando numerosos autores. Tal solução foi preparada

em solução 0,05 N de HCl, empregando os mesmos sais usados nos estudos sôbre o reconhecimento dos interferentes, no ítem 11.1. A composição da citada solução está descrita no quadro 30.

QUADRO 30 - Composição da solução equivalente a um extrato de vegetal, em relação aos cátions.

Cátion	Quantidade do cátion por 5 ml de solução
K^+	15 mg
Ca^{2+}	15 mg
Mg^{2+}	5 mg
Fe^{3+}	250 ug
Al^{3+}	250 ug
Mn^{2+}	250 ug
Cu^{2+}	250 ug
Zn^{2+}	250 ug
Co^{2+}	250 ug

Soluções padrões de boro. Com a solução anterior foram preparadas soluções padrões de boro contendo 0,20, 0,50, 0,80 e 2,00 microgramas dêsse elemento por mililitro.

Estudo preliminar. A primeira preocupação no estudo da eliminação dos interferentes pela referida técnica foi a respeito da acidez da solução eluida da resina.

Assim, procedeu-se da seguinte maneira: usando duas colunas de resina, foram passadas, em cada uma 5 ml de uma das soluções padrões anteriormente descritas, após o que as colunas foram lavadas com duas porções de 2 ml de água destilada, recebendo-se o eluido de uma delas num balão volumétrico de 25 ml e da outra num balão volumétrico de 10 ml. Completados os volumes, 5 ml dessas soluções foram titulados com solução padronizada de NaOH, usando fenolftaleína como indicador. No primeiro caso foi necessário 0,37 equivalente-miligrama de OH^- para a neutralização e no segundo 0,90 equivalente-miligrama de OH^-.

Com base nesses resultados e como se preten

de usar 5 ml do eluido para a determinação do boro, adotou-se o emprêgo de 1 ml de solução de NaOH a 5% (1,25 N) para neutralizar aquêle volume.

Procedimento 1. Neste experimento, junto do estudo da eficiência da resina na separação dos cátions, foi desenvolvido outro objetivando conhecer a técnica de lavagem da resina mais adequada para eluir todo o ânion borato. Cinco mililitros das soluções padrões contendo 0,50 e 2,00 microgramas de boro por mililitro foram passados pelas colunas de resina, as quais foram, em seguida, lavadas com diversas porções de água desmineralizada, conforme está descrito no quadro 31, recebendo-se os eluidos em balões volumétricos de 25 ml. O volume dos balões foi completado e 5 ml dessas soluções foram transferidos para copos de plástico de 100 ml, que já continham 1 ml de solução de NaOH a 5%, prosseguindo conforme já descrito no ítem 9.1. Para cada caso desenvolveu-se uma prova em branco usando solução de HCl 0,05 N no lugar do padrão de boro e os resultados obtidos com 5 repetições encontram-se descritos no quadro 31.

QUADRO 31 - Resultados da determinação do boro em soluções padrões contendo numerosos cátions, inclusive os interferentes, após terem sido passadas pela resina, eluidas com diferentes porções de água desmineralizada e recebendo os eluidos em balões volumétricos de 25 ml (média de 5 repetições).

ug de boro passados na resina	nº de lavagens	ug de boro determinados
2,50	3 x 5 ml	2,50 ± 0,00
2,50	3 x 2 ml	2,50 ± 0,00
2,50	2 x 2 ml	2,50 ± 0,00
10,00	3 x 5 ml	9,86 ± 0,03
10,00	3 x 2 ml	10,00 ± 0,00
10,00	2 x 2 ml	10,00 ± 0,00

Êsses dados permitem concluir que a resina conseguiu reter os cátions interferentes e que a eluição do

ânion borato pode ser feita com duas porções de 2 ml de água - desmineralizada.

Deve ser observado ainda que, em tôdas as - determinações, o resíduo sêco obtido no banho-maria não se dissolveu totalmente na solução de curcumina, permanecendo também na solução final, a qual necessitou ser filtrada antes de serem feitas as leituras.

Procedimento 2. Cinco mililitros das soluções padrões contendo 0,20 e 0,80 microgramas de boro por mililitro foram passados pelas colunas de resina, após o que as - mesmas foram lavadas com duas porções de 2 ml de água desmineralizada, recebendo-se os eluidos em balões volumétricos de 10 ml. O volume dos balões foi completado e 5 ml dessas soluções foram transferidos para copos de plástico de 100 ml, que já - continham 1 ml de solução de NaOH a 5%, prosseguindo conforme descrito no ítem 9.1. Para a prova em branco procedeu-se de - maneira idêntica usando solução 0,05 N de HCl no lugar do padrão de boro e os resultados, obtidos com 5 repetições, estão relatados no quadro 32.

QUADRO 32 - Resultados da determinação do boro em soluções padrões contendo numerosos cátions, inclusive os interferentes, recebendo os eluidos em balões volumétricos de 10 ml (média de 5 repetições).

ug de boro passados na resina	ug de boro determinados
1,00	1,00 ± 0,00
4,00	4,03 ± 0,01

Conclui-se, assim, que nenhuma dificuldade existe em diluir a solução eluida da resina a 10 ml, o que possibilita a aplicação do método na determinação do boro em vegetais que apresentem baixo teor dêsse elemento.

Cabem aqui também as mesmas considerações - feitas no procedimento anterior quanto à solubilidade do resí-

duo na solução de curcumina e a necessidade de filtração da solução final.

12 - Aplicação do método na determinação do boro em plantas.

12.1 - Contaminação pelo papel de filtro.

Quando se procedeu às primeiras aplicações do método na determinação do boro em materiais vegetais, notou-se um aumento relativamente grande no valor da absorbância da prova em branco. Como a única operação introduzida foi a filtração da suspensão constituida das cinzas da amostra de planta em HCl 0,05 N, suspeitou-se da contaminação pelo papel de filtro.

Inicialmente, determinou-se o conteúdo de boro nos dois tipos de papel de filtro que haviam sido usados: o Whatman nº 1 e o Schleicher & Schuell (S & S) 589, faixa branca. A determinação foi feita pelo método em aprêço encontrando-se, no primeiro, um teor de boro de 2,8 ppm e no segundo, de 14,1 ppm.

Em seguida, foram desenvolvidos dois experimentos, sendo um deles com a finalidade de se avaliar a contaminação pelos dois papéis citados e o outro com o objetivo de contornar tal inconveniente.

Reativos. Todos os reativos usados já foram citados anteriormente.

Procedimentos

Experimento 1. Apesar de conhecido o conteúdo de boro do papel Whatman nº 1 e do S & S 589, faixa branca, e considerando que a contaminação é consequência da lavagem do papel, julgou-se interessante comparar o teor de boro no filtrado de cada papel. Foram passados pelos respectivos papéis, de 6 centímetros de diâmetro, 10 ml de uma solução padrão de boro contendo 0,20 ug/ml em HCl 0,05 N. Em seguida, 5 ml dos filtrados foram transferidos para copos de plástico de

100 ml, os quais já continham 1 ml de solução de NaOH a 5%, prosseguindo conforme já descrito no ítem 9.1. Para a prova em branco procedeu-se de maneira idêntica, mas usando solução de HCl 0,05 N em lugar do padrão de boro e os resultados estão relacionados no quadro 33.

QUADRO 33 - Resultados da determinação do boro em soluções padrões, após terem sido passadas por papéis de filtro Whatman nº 1 e S & S 589, faixa branca (leituras contra o solvente).

ug de boro	Papel de filtro	Absorbância
0,00	sem filtração	0,01
0,00	Whatman nº 1	0,07
0,00	S & S 589	0,41
1,00	sem filtração	0,33
1,00	Whatman nº 1	0,39
1,00	S & S 589	0,94

Observa-se, portanto, que a intensidade da contaminação está diretamente ligada ao conteúdo de boro do papel, visto que o papel S & S 589, faixa branca, proporciona uma contaminação muito maior que o Whatman nº 1.

Experimento 2. A resolução do problema da contaminação foi tentada através do desenvolvimento de uma prova em branco em condições idênticas às determinações. Para isso foi usado o papel Whatman nº 1 que, como foi demonstrado, proporciona menor contaminação e, dentre os procedimentos que se pretende aplicar na determinação do boro em vegetais, escolheu-se aquêle que oferece maior possibilidade de contaminação, ou seja, o procedimento 2, descrito no ítem 11.2.2. Assim, 10 ml de uma solução padrão de boro, contendo 0,50 ug/ml em HCl 0,05 N, foram passados pelo papel Whatman nº 1 de 6 centímetros de diâmetro. Transferiram-se 5 ml do filtrado para balão volumétrico de 10 ml, completando-se o volume com água desmineralizada, após o que, 5 ml dessa solução foram colocados em copo de 100 ml que já continha 1 ml de solução de NaOH a 5%, prosseguin

do-se conforme descrito em 9.1. Para a prova em branco, procedeu-se de maneira idêntica usando solução de HCl 0,05 N em lugar do padrão de boro e os resultados obtidos com 3 repetições encontram-se no quadro 34.

QUADRO 24 - Resultados da determinação do boro em soluções padrões após terem sido passadas em papel Whatman nº 1 (leituras contra as respectivas provas em branco). Média de 3 repetições.

ug de boro nos 10 ml iniciais	Filtração	ug de boro determinados
0,00	não	0,00
0,00	sim	0,00
4,00	não	4,04
4,00	sim	3,92

Portanto, os dados do quadro 34 mostram que a contaminação pelo papel Whatman nº 1 é satisfatòriamente deduzida pela prova em branco.

12.2 - Influência da sílica.

Na retomada das cinzas de vegetais com solução de HCl, pode ocorrer a solubilização de uma certa quantidade de sílica, com formação de ácido silícido na forma coloidal. Segundo KOLTHOFF & SANDELL (1967), parte do ácido silícico de uma solução é coagulado e precipitado como hidrogel gelatinoso, pela adição de um ácido forte. Nessa precipitação o ânion borato e compostos de boro em geral são coprecipitados, se estiverem presentes na solução (SHELL, 1962). Condições semelhantes às descritas são encontradas na determinação do boro em plantas pelo método presente.

Em virtude da dificuldade existente no preparo de uma solução padrão de ácido silícico, o estudo sôbre o efeito dessa substância na determinação do boro, foi feito usando diversos vegetais altamente silicosos. Foram usados fôlhas de arroz (3,71% SiO_2), fôlhas de milho (5,99% SiO_2) e fô-

lhas de cana (1,25% SiO_2), procedendo-se a determinação em alí quotas diferentes de uma mesma amostra.

Reativos. Os reativos utilizados já foram citados anteriormente.

Procedimento. Em cápsula de porcelana foi incinerado 0,2500 g (para fôlhas de arroz e de milho) ou 0,5000 g (para fôlhas de cana) de cada amostra, devidamente preparada, a 500-550ºC, até a obtenção de cinza clara. As cinzas foram retomadas com 5 ml de solução de HCl 0,1 N, agitadas com bastão de vidro com ponta de borracha, adicionando, em seguida, mais 5 ml de água desmineralizada. A suspensão assim obtida foi filtrada por papel Whatman nº 1 de 6 centímetros de diâmetro e 5 ml dos filtrados foram passados pelas colunas de resina, as quais foram lavadas com duas porções de 2 ml de água desmineralizada, recebendo-se os eluidos em balões de 25 ml (no caso das fôlhas de arroz e de milho) ou de 10 ml (no caso das fôlhas de cana). O volume dos balões foi completado e de cada solução foram tomadas duas alíquotas diferentes (2 e 5 ml), as quais foram transferidas para copos de plástico de 100 ml, já contendo 1 ml de solução de NaOH a 5%. Daqui por diante procedeu-se como descrito em 9.1, tomando o cuidado de, após a adição da solução de curcumina, voltar os copos ao banho, por no máximo 3 minutos e à temperatura não superior a 90ºC, para dissolver o resíduo. Desenvolveu-se uma prova em branco para cada caso e os resultados obtidos encontram-se no quadro 35.

Assim, êsses dados demonstram que o método presente pode ser aplicado em materiais vegetais altamente silicosos, pois, nas condições usadas, não foi constatada qualquer influência da sílica.

12.3 - Solubilização do boro contido nas cinzas vegetais.

A retomada das cinzas vegetais tem sido feita, em geral, com solução de HCl, cuja concentração varia com os diversos autores. Assim, DIBLE, TRUOG & BERGER (1954) usam

QUADRO 35 - Resultados da determinação do boro em diversos vegetais com elevado teor de SiO_2.

Material	Teor de SiO_2(%)	Alíquota	ppm de boro
Fôlhas de arroz	3,71	2	11,2
Fôlhas de arroz	3,71	5	11,2
Fôlhas de milho	5,99	2	7,6
Fôlhas de milho	5,99	5	8,0
Fôlhas de cana	1,25	2	3,8
Fôlhas de cana	1,25	5	3,8

5 ml de solução 0,1 N, diluindo posteriormente com a adição de 5 ou 15 ml de água desmineralizada. JACKSON (1958) empregou apenas 10 ml de uma solução 0,1 N, enquanto JOHNSON & ULRICH (1959) utilizaram 5 ml de uma solução 1 N, diluindo, em seguida, normalmente a 25 ml.

Considerando que o uso de 5 ml de uma solução 0,1 N e posterior diluição com mais 5 ml de água desmineralizada proporcionaria uma solução cujo pH seria adequado para a retenção dos cátions pela resina, tal condição foi empregada. Contudo, foi notado, nas determinações, que aumentando a quantidade da amostra de 0,2500 g para 0,5000 g, o acréscimo na absorbância das soluções não ocorria na mesma proporção.

A fim de localizar a causa dêsse fenômeno, ou seja, se estava no preparo do extrato ou na determinação pròpriamente dita, foi desenvolvido o experimento adiante descrito, empregando diversos vegetais e que se baseou em alterações convenientemente feitas no procedimento do método em aprêço.

Reativos. Os reativos usados já foram citados anteriormente.

Procedimentos. Foram desenvolvidos três procedimentos diferentes.

Procedimento 1. Em cápsula de porcelana -

foi incinerado 0,2500gde cada amostra, devidamente preparada,- a 500-550ºC, até a obtenção de cinza clara. As cinzas foram - retomadas com 5 ml de solução de HCl 0,1 N, agitadas com bas-- tão de vidro provido de ponta de borracha, acrescentando, em seguida, 5 ml de água desmineralizada. A suspensão assim obti da foi filtrada por papel Whatman nº 1, de 6 centímetros de - diâmetro, e 5 ml do filtrado foram passados pelas colunas de - resina. Estas foram lavadas com três porções de 5 ml de água desmineralizada, recebendo-se os eluidos em balões de 25 ml. - Completado o volume dos balões, transferiram-se 5 ml dessas so luções para copos de plástico de 100 ml, os quais já continham 1 ml de solução de NaOH a 5%, prosseguindo-se, daqui por diante, como descrito no ítem 9.1, tomando-se o cuidado de, após a adição da solução de curcumina, voltar os copos ao banho-maria, por no máximo 3 minutos e à temperatura não superior a 90ºC, - para dissolver o resíduo. Uma prova em branco foi conduzida - de maneira idêntica, porém, sem conter amostra de planta.

Procedimento 2. Foi semelhante ao procedimento 1, usando-se, porém, 0,5000 g de cada amostra e passando pela resina sòmente 2,5 ml do extrato.

Procedimento 3. Foi semelhante ao procedimento 1, usando-se, porém, 0,5000 g de cada amostra.

Os resultados obtidos estão relacionados no quadro 36.

QUADRO 36 - Resultados da determinação do boro em vegetais, expressos em ppm, usando três diferentes procedimentos.

Materiais	Procedimentos		
	1	2	3
Feijão (planta tôda)	23,8	16,4	17,5
Algodão (fôlhas)	23,8	15,2	15,0
Citrus (fôlhas)	22,4	15,2	15,0
Capim colonião	11,2	10,0	9,4
Soja (fôlhas)	58,6	38,8	36,2

Comparando as variações efetuadas nos três procedimentos e os resultados obtidos, observa-se que as absorbâncias não estão de acôrdo nos procedimentos onde houve variação na quantidade da amostra incinerada (procedimento 1 e 3), mas houve concordância razoável nos procedimentos onde se variou apenas o volume do extrato usado para a determinação (procedimentos 2 e 3). Conclui-se, portanto, que o referido fenômeno deve estar relacionado com o preparo do extrato da planta.

Assim, as diversas possíveis causas foram abordadas. Supondo perda de boro durante a incineração das amostras, estas foram tratadas prèviamente com solução saturada de $Ca(OH)_2$, mas os resultados obtidos foram os mesmos. Em seguida, foi considerada a possibilidade de má incineração do material e, para tanto, as amostras foram queimadas em presença de NH_4NO_3, o que também não surtiu efeito. Finalmente, o problema foi estudado do ponto de vista da solubilização do boro contido nas cinzas. Julgando insuficiência de HCl na retomada das cinzas, conforme vinha sendo feito até agora, ou seja, com 5 ml de solução de HCl 0,1 N e mais 5 ml de água desmineralizada, passou-se a usar 10 ml da solução de HCl 0,1 N.

O experimento foi conduzido usando amostras de 0,2500 g e 0,5000 g de diversos vegetais cujas cinzas foram retomadas pelos dois processos citados. As determinações foram feitas de acôrdo com o procedimento 1, anteriormente descrito, sòmente que, para as amostras de cana, as resinas foram lavadas com duas porções de 2 ml de água desmineralizada, recebendo os eluidos em balões volumétricos de 10 ml. Para cada caso foi desenvolvida uma prova em branco e os resultados encontrados estão descritos no quadro 37.

Como se pode observar, os resultados obtidos para 0,2500 g das amostras, nos dois processos de retomada das cinzas, são comparáveis, o que possibilita concluir que todo o boro foi solubilizado em ambos os processos. Por outro lado, o quadro 37 permite deduzir que, para 0,5000 g das amostras, 5 ml de solução de HCl 0,1 N e mais 5 ml de água desmineralizada não foram suficientes para extrair todo o boro, com exceção das amostras de café e milho; porém, para tal quantida

QUADRO 37 - Resultados da determinação do boro em vegetais, expressos em ppm, em função do pêso da amostra e da quantidade de solução de HCl 0,1 N empregada na retomada das cinzas.

Materiais	Retomada: 5 ml HCl 0,1N+5 ml H_2O desm.		Retomada: 10 ml HCl 0,1N	
	amostra: 0,2500 g	amostra: 0,5000 g	amostra: 0,2500 g	amostra: 0,5000 g
Feijão(planta tôda)	22,4	16,9	23,8	22,4
Algodão (fôlhas)	23,8	14,7	22,4	21,8
Citrus (fôlhas)	22,4	15,0	22,4	21,8
Capim colonião	11,2	9,4	11,2	11,2
Café (fruto)	33,8	34,4	33,8	33,8
Milho (fôlha)	7,6	7,8	7,6	8,2
Cana (fôlha)	4,5	3,8	4,5	4,0
Cana (côlmo)	3,0	2,2	3,0	2,5

de de amostra, a retomada com 10 ml de solução de HCl 0,1 N proporcionou resultados satisfatórios, pois, são semelhantes aos obtidos, em iguais condições, usando 0,2500 g de amostra.

Face a êsses resultados e com o objetivo de uniformizar essa operação, adotou-se o emprêgo de 10 ml de solução de HCl 0,1 N para a retomada das cinzas, quer de 0,2500 g como de 0,5000 g da amostra.

Convém esclarecer ainda que o uso de solução de HCl 0,1 N não afeta a eficiência da resina na retenção dos cátions (GLÓRIA & VITTI, 1968).

12.4 - Estudo da precisão e da exatidão.

Completando o estudo da aplicação do método em vegetais, procedeu-se a avaliação da sua precisão e exatidão, quando empregado na determinação do boro nos referidos materiais.

Para o estudo da precisão foram usados diversos vegetais, cujo conteúdo de boro foi determinado com cinco -

repetições.

Reativos. Os reativos usados já foram citados anteriormente.

Procedimento. As determinações foram feitas de acôrdo com o procedimento 1, descrito no ítem 12.3, apenas que, para as amostras de cana, as resinas foram lavadas com duas porções de 2 ml de água desmineralizada, recebendo-se o eluido num balão volumétrico de 10 ml. Para cada caso foi desenvolvida uma prova em branco e os resultados obtidos estão relatados no quadro 38.

QUADRO 38 - Estudo da precisão do método através da variação dos resultados obtidos na determinação do boro em plantas (5 repetições).

Materiais	ppm de boro	C.V.(%)
Café (fôlhas)	72,7 ± 0,28	0,87
Café (frutos)	32,2 ± 0,24	1,68
Citrus (fôlhas)	22,4 ± 0,00	0,00
Arroz (fôlhas)	11,2 ± 0,00	0,00
Cana (fôlhas)	4,3 ± 0,12	6,28

Pelo exame dos desvios padrões das médias e dos coeficientes de variação, apresentados no quadro 38 e considerando que o coeficiente de variação médio calculado para os cinco vegetais é de 1,77%, pode-se concluir que o método tem satisfatória precisão, para a determinação do boro em vegetais.

A exatidão do método foi avaliada através de um ensaio de recuperação, trabalhando com as mesmas amostras usadas no estudo da precisão. Os reativos e o procedimento também foram os mesmos, apenas que, antes da incineração, foram adicionados sôbre as amostras já pesadas, 1 ml de solução padrão de boro contendo 4,88 ug/ml (em água desmineralizada) e 1 ml de solução saturada de $Ca(OH)_2$ (para prevenir perda de boro), sendo posteriormente sêcas em estufa a 70-80ºC. Foi

conduzida uma prova em branco com o mesmo tratamento, porém, sem as amostras. Os dados obtidos com 5 repetições, assim como os cálculos relativos à quantidade de boro recuperada, estão no quadro 39.

QUADRO 39 - Resultados do ensaio de recuperação do boro em plantas. Médias de 5 determinações.

Materiais	ppm de boro			% de recuperação
	adicionado	determinado	recuperado	
Café (fôlhas)	0,0	72,7 ± 0,28		
Café (fôlhas)	19,5	91,2 ± 0,00	18,5	98,9
Café (frutos)	0,0	32,2 ± 0,24		
Café (frutos)	19,5	52,1 ± 0,92	19,9	100,8
Citrus (fôlhas)	0,0	22,4 ± 0,00		
Citrus (fôlhas)	19,5	41,0 ± 0,24	18,6	97,9
Arroz (fôlhas)	0,0	11,2 ± 0,00		
Arroz (fôlhas)	19,5	30,0 ± 0,38	18,8	97,7
Cana (fôlhas)	0,0	4,3 ± 0,12		
Cana (fôlhas)	19,5	23,3 ± 0,21	19,0	97,9

Portanto, em vista dos dados apresentados, pode-se considerar que o método é dotado de apreciável exatidão, quando aplicado na determinação do boro em plantas.

IV - CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos neste trabalho sôbre o método da curcumina de determinação do boro, que se fundamenta na formação do complexo rosocianina em meio acético-sulfúrico, levaram às seguintes conclusões:

1 - A curcumina protonada, que absorve luz no mesmo comprimento de onda da rosocianina, é desprotonada por diluição com álcool etílico. Para a completa desprotonação da curcumina, desenvolvendo-se a reação empregando 3 ml de solução acética de curcumina a 0,125% e 2 ml de solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), foi necessário diluir essa mistura a 50 ml, usando álcool etílico a 75%.

2 - A velocidade de formação da rosocianina é afetada pelo volume e concentração da solução de curcumina, volume da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) e principalmente pela presença de água. Porém, não o é pela quantidade de boro a ser determinada.

3 - O desenvolvimento da reação usando 3 ml da solução de curcumina a 0,125% e 2 ml da solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1) é considerado satisfatório, visto que nessas condições a reação se completa em 15 minutos, mesmo na presença de 0,2 ml de água além da normalmente contida nos reagentes citados.

4 - A máxima absorção de luz pelas soluções contendo o complexo rosocianina, formado nas condições estudadas, ocorre entre os comprimentos de onda de 538 a 542 milimicrons. Por outro lado, o filtro do colorímetro Klett-Summerson que oferece maior sensibilidade é o de número 55, cuja faixa de transmitância está entre 520 e 600 milimicrons.

5 - Os reagentes, ou seja, a solução a 0,125% de curcumina em ácido acético glacial e a solução de H_2SO_4-$H_4C_2O_2$ (1 + 1), são estáveis por um período de, pelo menos, 15 dias. O método é tolerante à água absorvida por êsses reagentes, pois, foram colocados num ambiente de 90ºC de umidade relativa e 26ºC, por 5 horas, e nenhuma variação foi verifi

cada na absorbância das soluções.

6 - Quanto a influência da temperatura sôbre a reação, esta se desenvolve normalmente entre 18ºC e 35ºC. Já a 40ºC há um pequeno decréscimo na absorbância das soluções, acentuando-se a 50ºC.

7 - Dentre os solventes estudados para diluir a mistura das soluções reagentes contendo o complexo, após o término da reação, o álcool etílico em solução aquosa a 75% foi considerado o mais adequado. Neste solvente a côr das soluções é estável por, no mínimo, 90 minutos, e a absorbância das mesmas não varia quando submetidas à filtração por papel Whatman nº 1.

8 - Nas condições em que o método foi desenvolvido, a amplitude de concentração de boro em que o mesmo apresenta menor êrro encontra-se entre os valores de 0,25 a 5,00 microgramas em 50 ml de solução, no comprimento de onda de 540 milimicrons. Nesta amplitude a relação entre a quantidade de boro e a absorbância é linear. Em relação a precisão, os resultados são reprodutíveis quando o método é aplicado em soluções puras.

9 - Dentre os elementos normalmente encontrados nas cinzas vegetais, os que influem no presente método são o cálcio (Ca^{2+}), o magnésio (Mg^{2+}) e mais acentuadamente o ferro (Fe^{3+}), o manganês (Mn^{2+}) e o cobalto (Co^{2+}). O molibdênio (MoO_4^{2-}) intensifica a côr amarela da curcumina, sem, contudo, interferir. Portanto, todos os íons interferentes são cátions.

10 - O problema dos interferentes foi satisfatòriamente resolvido eliminando-os da solução através do uso de resina trocadora de cátions. O ânion borato passa intacto por essa resina.

11 - Papéis de filtro podem conter boro, contaminando as soluções passadas através dêles. O papel Whatman nº 1 empregado apresentou 2,8 ppm de boro e o Schleicher & Schuell (S & S) 589, faixa branca, 14,1 ppm. Usando o papel Whatman nº 1 de 6 centímetros de diâmetro, a contaminação pôde

ser contornada desenvolvendo uma prova em branco completamente semelhante às determinações.

12 - O boro contido nas cinzas provenientes da incineração de 0,5000 g de material de planta, nem sempre é totalmente solubilizado em 5 ml de solução 0,1 N de HCl e mais 5 ml de água desmineralizada. Porém, a solubilização completa foi conseguida, para uma série de vegetais diversos, empregando-se 10 ml de solução 0,1 N de HCl.

13 - O método, conforme é preconizado, pode ser considerado eficiente na determinação do boro em plantas. Mostrou possuir exatidão e precisão satisfatórias, aliadas a sua alta sensibilidade, permitindo determinar desde 2 ppm de boro, dentro do seu intervalo de menor êrro.

14 - Assim, a técnica da determinação do boro em plantas pelo referido método é sugerida como segue.

Preparo da curva padrão

a) Transferir 1 ml das soluções padrões de boro (em água desmineralizada) contendo 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 e 2,50 microgramas por mililitro, para copos de plástico de 100 ml, os quais já devem conter 1 ml de solução de NaOH a 5%.

b) Homogeneizar e colocar os copos em banho-maria até secagem completa.

c) Retirar do banho, esperar esfriar, adicionar 3 ml de solução acética de curcumina a 0,125% e voltar os copos ao banho para dissolver os resíduos por, no máximo, 3 minutos, sendo que a temperatura do banho não deve exceder a 90ºC.

d) Deixar esfriar, adicionar 2 ml de solução de ácido sulfúrico-ácido acético (1 + 1), homogeneizar e deixar reagir por 15 minutos.

e) Juntar, ao conteúdo dos copos, álcool etílico a 75%, transferir para balões volumétricos de 50 ml e, com o mesmo álcool, completar o volume dos balões, tomando o

cuidado de deixar esfriar, por alguns minutos, antes de se atingir o volume final.

f) Filtrar, se necessário, e proceder a leitura das soluções a 540 milimicrons, ou usando o filtro nº 55 do colorímetro Klett-Summerson.

g) Desenvolver uma prova em branco usando 1 ml de água desmineralizada no lugar do padrão de boro. Recomenda-se que todo o material de vidro ou de plástico utilizado, seja prèviamente lavado com solução de HCl (1 + 1).

Procedimento

a) Pesar 0,2500 ou 0,5000 g da amostra sêca e moída, transferir para uma cápsula de porcelana e incinerar a 500-550ºC até a obtenção de cinza clara.

b) Retirar do fôrno, deixar esfriar e adicionar 10 ml de solução de HCl 0,1 N, agitando, em seguida, com um bastão provido de ponta de borracha.

c) Filtrar por papel Whatman nº 1 de 6 centímetros de diâmetro.

d) Passar 5 ml do filtrado através da coluna de resina catiônica (montada conforme descrito no ítem 11.2.1) e lavar a coluna com, no mínimo, duas porções de 2 ml de água desmineralizada, recebendo-se os eluidos num balão volumétrico de 10 ml ou de 25 ml.

e) Completar o volume e transferir 5 ml dessa solução para copo de plástico de 100 ml, o qual já deve conter 1 ml de solução de NaOH a 5%. Prosseguir conforme foi descrito para a curva padrão, a partir do ítem b.

f) Desenvolver uma prova em branco a partir do ítem b dêste procedimento.

V - RESUMO

O presente trabalho relata os estudos desenvolvidos sôbre o método da curcumina de determinação do boro, baseado na formação do complexo rosocianina em meio acético-sulfúrico, abordando diversos aspectos.

Assim, inicialmente, foram estudadas as condições que garantem a total desprotonação da curcumina após a reação ter-se completado e a velocidade da reação, procedendo, em primeiro lugar, o reconhecimento dos fatôres que nela influem, estudando-os, posteriormente, de uma forma integrada, possibilitando assim concluir sôbre as condições mais adequadas para o desenvolvimento da reação.

Nestas condições foi confeccionada a curva de absorção do complexo, encontrando que a absorção máxima ocorre no comprimento de onda de 540 milimicrons e o filtro do colorímetro Klett-Summerson que oferece maior sensibilidade é o de nº 55.

As diversas situações que possibilitam a introdução de água no meio reagente foram consideradas, tais como a absorção de umidade pelo resíduo sêco e pelos reagentes, em virtude da água diminuir acentuadamente a velocidade da reação.

Dentre os solventes estudados, o álcool etílico em solução aquosa a 75%, mostrou-se o mais conveniente. Também foram objetos de estudo a estabilidade do complexo nos diversos solventes, assim como no meio reagente, a influência da temperatura na reação e o efeito da filtração sôbre a absorbância das soluções coloridas.

A amplitude de concentração de boro em que o método apresenta menor êrro está compreendida entre 0,25 e 5,00 microgramas em 50 ml de solução, sendo que, nesse intervalo, a relação entre a quantidade de boro e a absorbância é linear. Por outro lado, a precisão do método é satisfatória.

Dos elementos normalmente encontrados em -

cinzas de vegetais, os que interferem no citado método são o - cálcio (Ca^{2+}), o magnésio (Mg^{2+}), o ferro (Fe^{3+}), o manganês - (Mn^{2+}) e o cobalto (Co^{2+}). Êsses elementos foram eliminados - do extrato de planta, passando-o através de resina trocadora - de cátions.

Aplicando o método na determinação do boro em plantas, foram estudadas, preliminarmente, a concentração - da solução de HCl necessária para solubilizar todo o boro contido nas amostras incineradas e a contaminação do extrato de - vegetal pelo papel de filtro, como consequência da filtração a que deve ser submetido. Finalmente, avaliou-se a eficiência - do método na referida aplicação, concluindo-se que o mesmo apresenta satisfatória precisão e exatidão e elevada sensibilidade.

VI - BIBLIOGRAFIA CITADA

AYRES, G.H., 1949 - Evaluation of accuracy in photometric analysis. Analyt. Chem. 21: 652-657.

BERGER, K.C., 1949 - Boron in soils and crops. Em: Advances in Agronomy, vol. 1, p. 321-351. Editado por A.G. Norman, Academic Press Inc., Publishers. New York.

BERGER, K.C. & P.F. PRATT, 1963 - Advances in secondary and micronutrient fertilization. Em: Fertilizer Technology and Usage, p. 287-340. Editado por M.H. Mc Vickar, G. L. Bridger & L.B. Nelson, Soil Science Society of America.

BITTENCOURT, V.C., 1965 - O método colorimétrico da 1,10-fenantrolina na determinação do ferro. Tese apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de "Doutor em Agronomia". U.S.P., Piracicaba. 78 pp mimeografadas.

BRADFORD, G.R., 1966 - Boron. Em: Diagnostic Criteria for Plants and Soils. p. 33-61. Editado por H.D. Chapman, University of California. Division of Agricultural Chemistry.

BRASIL SOBRº, M.O.C., 1965 - Levantamento do teor de boro em alguns solos do Estado de São Paulo. Tese apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de Docente-Livre. U.S.P., Piracicaba. 135 pp mimeografadas.

CHAPMAN, H.D. (ed.), 1966 - Diagnostic Criteria for Plants and Soils. University of California. Division of Agricultural Chemistry. 793 pp.

COGBILL, E.C. & J.H. YOE, 1955 - Derivatives of anthrarufin, chrysazin and quinizarin as colorimetric reagents for boron. Analytica chim. Acta, 12: 455-463.

CRAWLEY, R.H.A., 1964 - A modification of the curcumin method for determining boron, for possible application to continuous analysis of aqueous solutions. Analyst, Lond, 89: 749-750.

DIBLE, W.T., E. TRUOG & K.C. BERGER, 1954 - Boron determination in soils and plants. Analyt Chem., 26: 418-421.

DUCRET, L., 1957 - Separation et dosage de traces de bore dans le silicium. II. Nouvelle methode de separation et de dosage de traces de bore. Aplication au dosage du bore dans le silicium. Analytica chim. Acta, 17: 213- - 219.

DUCRET, L. & P. SEGUIN, 1957 - Separation et dosage de traces de bore dans le silicium. I. Application de la methode d'extraction chloroformique sons forme de fluoborate de tetraphenylarsonium. Analytica chim. Acta, 17: 207-212.

ELLIS, G.H., E.G. ZOOK & O. BAUDISCH, 1949 - Colorimetric - determination of boron using 1,1'-dianthrimide. Analyt. Chem. 21: 1345-1348.

ELWELL, W.T. & D.F. WOOD, 1963 - Determination of boron in - zirconium, hafnium and titanium. Analyst, Lond, 88: - 475-476.

FREEGARDE, M. & J. CARTWRIGHT, 1962 - The determination of - boron in zircaloy. Analyst, Lond, 87: 214-216.

FURMAN, N.H., 1962 - Standard Methods of Chemical Analysis. - Vol. I, 6ª ed. Editado pelo autor. D. Van Nostrand - Company, Inc., New York. 1401 pp..

GLÓRIA, N.A., 1968 - A determinação colorimétrica do enxôfre - pelo método do cloranilato de bário. Tese apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de Docente-Livre. U.S.P., Piracicaba. 134 pp. mimeografadas.

GLÓRIA, N.A. & G.C. VITTI, 1968 - Emprêgo de coluna trocadora de cátions na separação de cátions e ânions de extrato de material vegetal. No prelo dos Anais da Esc. - sup. Agric. "Luiz Queiroz", U.S.P., Piracicaba.

GOLDSCHMIDT, V.M., 1954 - Geochemistry. Editado por Alex Muir, at the Clarendon press, Oxford. 730 pp..

GOWARD, G.W. & V.R. WIEDERKEHR, 1963 - Sensitivities and other properties of reagents for the spectrophotometric determination of boron. Analyt. Chem., 35: 1542-1545.

GRIMMEL, H.W., 1953 - Organic dyes. Em: Organic Chemistry. p. 243-391. Editado por H. Gilman. John Wiley & Sons, Inc., New York.

GRINSTEAD, R.R. & S. SNIDER, 1967 - Modification of the curcumin method for low level boron determination. Analyst, Lond, 92: 532-533.

HARPER, S.H., 1956 - Di- and poly-phenyl paraffins and their derivatives. Em: Chemistry of Carbon Compounds, vol. III^{B}, p. 1116-1219. Editado por E.H. Rodd, Elsevier Publishing Company, New York.

HARRISON, T.S. & W.D. COBB, 1966 - The determination of boron in mild steel. Analyst, Lond, 91: 576-581.

HATCHER, J.H., 1960 - Wet digestion of plant material gives low boron values. Analyt. Chem., 32: 726.

HAYES, M.R. & J. METCALFE, 1962 - The boron-curcumin complex in the determination of trace amounts of boron. Analyst, Lond, 87: 956-969.

HAYES, M.R. & J. METCALFE, 1963 - The determination of traces of boron in zirconium and zirconium alloys. Analyst, Lond, 88: 471-474.

HOGDSON, J.F., 1963 - Chemistry of the micronutrient elements in soils. Advances in Agronomy, vol. 17, p. 119-159. Editado por A.G. Norman, Academic Press, New York.

JACINTHO, A.O., 1967 - A determinação do cobre pelo método colorimétrico do dietilditiocarbamato de sódio. Tese apresentada à E.S.A. "Luiz de Queiroz" para obtenção do título de "Doutor em Agronomia". U.S.P., Piracicaba. 82 pp mimeografadas.

JACKSON, M.L., 1958 - Soil Chemical Analysis. Prentice-Hall, Inc.. Englewood Cliffs, New Jersey. 498 pp..

JOHNSON, C.M. & A. ULRICH, 1959 - Analytical methods for use in plant analysis. California Agricultural Experimental Station. Bulletin 766: 26-78.

J.T. BAKER CHEMICAL Co., 1958 - Reagent Dowex. Ion Exchange Resins Product. Bulletin 103. J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey, 15 pp.

KOLTHOFF, I.M. & E.B. SANDELL, 1967 - Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. The MacMillan Company, New York. 759 pp..

LIMA, F.W., C. PAGANO & B. SCHNEIDERMAN, 1960 - Statistical analysis of spectrophotometric determination of boron. Analyst, Lond, 85: 909-915.

LOTT, W.L., A.C. McCLUNG, R. VITA & J.R. GALLO, 1961 - Levantamento de cafezais em São Paulo e Paraná pela análise foliar. IBEC Research Institute, boletim nº 26.

LUKE, C.L., 1955 - Determination of traces of boron in silicon, germanium and germanium dioxide. Analyt. Chem., 27: 1150-1153.

LUKE, C.L. & S.S. FLASCHEN, 1958 - Photometric determination of traces of boron in silicon. Analyt. Chem., 30: 1406-1409.

MALAVOLTA, E., H.P. HAAG, F.A.F. DE MELLO & M.O.C. BRASIL SOBRº, 1967 - Nutrição Mineral de Algumas Culturas Tropicais. Livraria Pioneira Editôra. Editôra da Universidade de São Paulo. 251 pp..

MAYNARD, L.A. & J.K. LOOSLI, 1962 - The inorganic elements and their metabolism. Em: Animal Nutrition, 5th ed.. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York. 533 pp.

MUTO, S., 1953 - Geochemistry of Boron. III - Boron in rain water. Chem. Abstr., 47: 2553.

NAFTEL, J.A., 1939 - Colorimetric microdetermination of boron. Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed., 11: 407-409.

PASZTOR, L., J.T. BODE & Q. FERNANDO, 1960 - Determination of micro quantities of boron in steel by a solvent extraction method. Analyt. Chem., 32: 277-281.

PORTER, G. & R.C. SHUBERT, 1958 - Boron. Em: Colorimetric Determination of Nonmetals - Chemical Analysis, Vol. 8, p. 339-353. Editado por D.F. Boltz. Interscience Publishers, New York.

RINGBOM, A., 1939 - Uber die Genauigkeit der colorimetrischen Analysenmethoden I.Z. Analyt. Chem., 115: 332-343.

SHELL, H.R., 1962 - Silicon. Em: Treatise on Analytical - Chemistry. Part II, vol. 2, p. 107-206. Editado por I.M. Kolthoff e P.J. Elving, Interscience Publishers, New York.

SKOL'NIK, M., 1965 - The physiological role of boron in plants. Borax Consolidated Limited-Borax House. Carlisle - Place London S.W.I.

SPICER, G.S. & J.D.H. STRICKLAND, 1952-a - Compounds of - curcumin and boric acid. Part I. The Structure of - rosocianin. J. chem. Soc., 4: 4644-4650.

SPICER, G.S. & J.D.H. STRICKLAND, 1952-b - Compounds of - curcumin and boric acid. Part II. The Structure of - rubrocurcumin. J. chem. Soc., 4: 4650-4653.

SPICER, G.S. & J.D.H. STRICKLAND, 1958 - The determination of microgram and sub-microgram amounts of boron. Part I. Absortiometric determination using curcumin. Analytica chim. Acta, 18: 231-239.

SWAINE, D.J., 1955 - The trace element content of soils. - Commonwealth Bureau of Soil Science, technical - communication nº 48. Commonwealth Agricultural Bureaux, England. 157 pp.

THE MERCK INDEX OF CHEMICAL AND DRUGS, 1960 - Merck & Co., Inc., New Jersey, 1642 pp.

THIERIG, D. & F. UMLAND, 1965 - Photometrishe Borbestimmung in Nanogramm-Bereich nach Extraktion des Bor-Curcumin-Komplexes. Z. Anal. Chem., Bd., 211: 161-169.

UNDERWOOD, E.J., 1962 - Trace Elements in Human and Animal - Nutrition. 2nd ed., Academic Press Inc., New York. - 429 pp.

UPHOF, J.C., 1959 - Dictionary of Economic Plants. Published by H.R. Engelmann (J. Cramer). Hafner Publishing Co., New York. 400 pp.

WEAST, R.C., S.M. SELBY & C.D. HOGDMAN (ed.)., 1964-1965 - Handbook of Chemistry and Physics, 45th ed.. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.

X-X-X-X-X