

# Nuevos métodos de determinación de boro por espectrofotometría de absorción UV-Visible y por fluorescencia molecular, previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol. Aplicación al análisis de material vegetal

por J. Aznárez Alduán, A. Bonilla Polo y J. M. Mir Marín

Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

Recibido el 20-VII-1979

## ABSTRACT

AZNÁREZ, J., BONILLA, A. and MIR, J. M., 1979.—New methods for B determination by UV-VIS Absorption and by molecular fluorescence, after extraction with 2-methyl-2,4-pentanediol. Application for plant material analysis. *An. Aula Dei*, 14 (3/4): 510-518.

In this paper the application for the determination of boron in plant materials by two new methods, based on the extraction of the ester boric acid-2-methyl-2,4-pentanediol into MIBK, is studied. The extraction is made from 5-6 M. hydrochloric acid medium. After the extraction, the determination of boron by the spectrophotometric method is made with curcumine in the same organic phase resulting from the extraction, by the addition of phosphoric and acetic acids. The Sandell sensitivity is  $0,011 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  of boron in the final organic phase.

In the fluorometric method, dibenzoylmethane is used as fluorescence reagent in the same organic phase of the extraction by the addition of phosphoric acid. Then the sensitivity is  $1,09 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  of boron in the final organic phase.

In both new methods, the presence in aqueous solution of those elements generally present in plant ashes and many other does not interfere with the determination of boron.

Twelve plant samples have been analyzed. In the spectrophotometric method the maximum variance coefficient obtained is  $\pm 5\%$  (six determinations for each sample); in the fluorometric method, it is  $\pm 6\%$  (ten determinations for each sample).

The selectivity, reproductiveness and precision reached make the proposed methods suitable for the determination of boron in plant materials, natural waters, soils, environmental contamination and animal tissues.

## I. INTRODUCCION

Es bien conocida la importancia del boro como oligoelemento en la fisiología vegetal, por las diferentes funciones en las que interviene, como transporte de los azúcares, metabolismos de los fenoles, metabolismo de RNA y en la actividad de la alfaamilasa (BONNER y VARNER, 1976).

Los métodos analíticos más utilizados hasta el momento para la determinación de boro en materia vegetal son: por volumetría ácido-base con manitol (TROKVA y VOKRAL, 1974); por espectrofotometría de absorción molecular uv-visible, con quinalizarina (POCHINOC y KAUSE, 1960), con curcumina (WILLIAMS, *et al.*, 1961) y con azometina H (PINTA, *et al.*, 1975); por fotometría de llama (PAU, *et al.*, 1972); por espectrofotometría de absorción atómica (CLITON, 1974 y ELTON-BOTT, 1976). No obstante, todos los métodos citados adolecen de una falta de selectividad que exige una separación previa a la determinación, ya sea por destilación de los ésteres metílicos del ácido bórico (ELTON-BOTT, 1976), por medio de resinas de intercambio iónico o por extracción (PINTA, *et al.*, 1976).

La extracción, uno de los métodos más cómodos y rápidos de separación, no ha sido aprovechada suficientemente en esta determinación, ya que normalmente se efectúa, seguidamente, la eliminación del disolvente orgánico y la posterior disolución del residuo obtenido, o una reextracción del ácido bórico a fase acuosa, en donde se procede a la determinación del boro, con los inconvenientes de un mayor consumo de tiempo, posibilidades de contaminación y pérdida de sensibilidad.

En trabajos anteriores (AZNÁREZ *et al.*, 1979) se han estudiado y propuesto dos métodos nuevos para la determinación de boro, que evitan los inconvenientes citados. Ambos métodos se basan en la extracción del ácido bórico por formación del éster con el 2-metil-2,4-pentanodiol y su extracción a metil-isobutil-cetona (MIBC). Esta extracción se puede realizar en medio 1,8-2,5 M. en ácido sulfúrico, pero se ha observado experimentalmente la pérdida de ácido bórico en presencia de elementos alcalinotérreos, debido a procesos de adsorción por el precipitado de sulfatos de calcio o de bario, por lo que se considera que este medio de extracción no es conveniente para el análisis de material vegetal.

La extracción cuantitativa del ácido bórico se puede efectuar también a partir de solución clorhídrica (de 5 a 6 M.), con lo que se evita la dificultad mencionada, aunque a costa de una pérdida de selectividad, ya que se produce la extracción de hierro (III), oro (III),

antimonio (III), arsénico (III) y molibdeno (VI) en forma de cloro-complejos de oxonio, extraíbles por la MIBC. Esta dificultad se elimina fácilmente mediante un lavado previo de la solución acuosa con MIBC, como se indica en un trabajo anterior (AZNÁREZ *et al.*, 1979).

Una vez efectuada la extracción, la determinación de boro se realiza por espectrofotometría de absorción uv-visible con curcumina como reactivo en la misma fase orgánica procedente de la extracción, en presencia de ácidos fosfórico y acético. De forma semejante se efectúa la determinación fluorométrica mediante la formación del compuesto fluorescente del ácido bórico con el dibenzoilmetano (DBM), en la fase orgánica de extracción y en presencia de ácido fosfórico como agente deshidratante.

La notable sensibilidad, reproducibilidad y precisión conseguidas en los métodos propuestos, nos han llevado a su aplicación a la determinación de boro en material vegetal, finalidad del presente trabajo.

## II. REACTIVOS

Solución patrón de ácido bórico. Preparada por pesada y disolución de ácido bórico seco (Merck) en agua bidestilada. Concentración de  $1.000 \mu\text{g. ml}^{-1}$  de boro.

Solución de extracción. Solución al 20 % (V/V) de 2-metil-2,4-pentanodiol (Merck) en metil-isobutil-cetona (Doesder).

Solución de curcumina. Solución al 0,1 % (M/V) de curcumina (Merck) en ácido acético glacial (Merck). Solución preparada en el momento de su uso.

Solución de dibenzoilmetano. Solución al 0,1 % (M/V) de dibenzoilmetano (Koch-Light) en metil-isobutil-cetona (Doesder).

Ácidos clorhídrico, fosfórico y acético glacial, concentrados (Merck). Sulfato sódico anhidro (Merck).

Solución de sulfato de quinina. Solución al 0,05 % (M/V) de sulfato de quinina (Scharlau) en ácido sulfúrico 0,1 N.

### III. MATERIAL

En las determinaciones se ha utilizado material de teflón, polietileno, cuarzo o platino en sustitución del vidrio siempre que ha sido posible, para evitar la contaminación debida al boro del vidrio de laboratorio.

El material vegetal analizado ha sido facilitado por M. PINTA, del Comité Interinstitutos de Análisis Foliar, en forma de hojas secas ya preparadas para la determinación analítica, según normas de dicho Comité.

Las hojas de los vegetales analizados han sido: *hevea* (procedente de Costa de Marfil), *palmera* (Africa), *eucalipto* (España), *viña* (Francia), *naranja* (España), *olivo* (España), *melocotonero* (Francia), *codia* (Nueva Caledonia), *maíz* (España), *manzano Cox Orange* (Francia), *manzano Golden* (Bélgica) y *algodonero* (Africa). Los contenidos en otros diferentes elementos presentes en las hojas analizadas se encuentran reseñados en los trabajos de PINTA (1973, 1975 y 1976), donde también figuran los métodos analíticos utilizados.

Para la realización del presente trabajo se han utilizado las siguientes aparatos e instrumental:

- Agitador mecánico Kottermann.
- Baño termostático Gebrüder-Haake.
- Espectrofotómetro Pye-Unicam SP 8-100, con equipo especial para medidas de fluorescencia molecular.

### IV. RESULTADOS

#### IV.1. Método por absorción UV-visible

El procedimiento seguido para la determinación de boro en las muestras de vegetales por absorción en el uv-visible, ha sido el siguiente:

Una muestra de 0,5 a 3 g de materia seca, según el contenido de boro en la planta, se pesan exactamente y se calcinan a 500 °C en un crisol de platino hasta pesada constante. Las cenizas se disuelven en ácido clorhídrico (1 + 1) y finalmente se llevan a volumen en matraz aforado con dicho ácido. Se toma un volumen medido de esta solución y en un embudo de separaciones de 100 ml de capacidad,

se extrae con 10 ml de solución de extracción, agitando durante 5 minutos. Separadas las fases, la orgánica se deseca cuidadosamente con sulfato sódico anhidro. Un volumen medido del extracto se mezcla en un tubo de ensayo de polietileno con 2 ml de solución acética de curcumina, 2 ml de ácido fosfórico concentrado y el volumen restante hasta 7 ml, con MIBC. Los tubos se calientan 60 minutos en baño termostático a una temperatura de  $70 \pm 3$  °C. Se mide la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 510 nm entre los 15 y 60 minutos después de enfriar la solución a la temperatura ambiente.

Como solución de referencia en la medida de la absorbancia se emplea una preparada simultáneamente y exenta de boro. Al mismo tiempo se obtiene una curva de calibrado con soluciones conocidas de boro preparadas por dilución de la solución patrón de ácido bórico.

El intervalo de respuesta lineal entre absorbancia y la concentración de boro es de 0,5 a 5  $\mu\text{g. ml}^{-1}$  de boro en fase orgánica final de medida. La sensibilidad de la determinación, según la definición de Sandell, es de 0,011  $\mu\text{g. cm}^{-2}$  de boro en fase orgánica.

En un trabajo anterior (AZNÁREZ, *et al.*, 1979) se ha comprobado, mediante el estudio de las interferencias al método, que la presencia en solución acuosa de todos los elementos normalmente presentes en las cenizas de plantas no producen interferencias en la determinación de boro.

El valor medio y el coeficiente de variación ( $\frac{\sigma_m}{x} \cdot 100$ ) para seis determinaciones efectuadas en cada una de las muestras analizadas vienen indicados en el cuadro 1. Puede observarse que el coeficiente de variación (C.V.) en ningún caso superó el  $\pm 5\%$ .

#### IV.2. Método por fluorescencia

El procedimiento seguido para la determinación de boro en muestras vegetales por fluorescencia molecular ha sido el siguiente:

Una muestra de 0,5 a 1 g de materia seca, según normas, se pesa exactamente y se calcina a 500 °C en crisol de platino hasta pesada constante. Las cenizas se tratan con ácido clorhídrico (1+1) y se lleva a volumen en matraz aforado con dicho ácido. Un volumen medido de esta solución se extrae con 10 ml de solución extractante mediante agitación durante 5 minutos. Separadas las fases, la orgánica se deseca cuidadosamente con sulfato sódico anhidro. Un volumen medido del extracto se mezcla en un tubo de ensayo de polietileno

con 2 ml de solución de DBM, MIBC hasta completar un volumen de 5 ml y 2 ml de ácido fosfórico concentrado. Los tubos de polietileno se calientan durante 30 minutos en baño termostático a  $80 \pm 3$  °C. Se mide la intensidad de fluorescencia de las soluciones entre los 15 y 45 minutos después de su enfriamiento a la temperatura ambiente, frente a una solución de sulfato de quinina, utilizando una longitud de onda de excitación de 390 nm y filtro de corte Kodak 2B para la emisión. Simultáneamente se obtiene una curva de calibrado con soluciones conocidas de boro por dilución de la solución patrón de ácido bórico.

El intervalo de respuesta lineal para la recta de calibrado es de 20 a 200 ng.ml<sup>-1</sup> de boro en la fase orgánica final. La sensibilidad de la determinación (Absb. = 0,0044) es de 1,09 ng.ml<sup>-1</sup> de boro en fase orgánica final. Los elementos normalmente presentes en las cenizas de las plantas, así como otros muchos, no producen interferencias en la determinación, como se ha demostrado en un trabajo anterior (AZNÁREZ y BONILLA, 1979).

El valor medio y el coeficiente de variación (C.V.) para 10 determinaciones de cada una de las muestras de plantas citadas anteriormente se indican en el cuadro 1, donde también se señalan los resultados obtenidos para las mismas muestras por M. PINTA. Se observa que en ningún caso el coeficiente de variación superó el  $\pm 6\%$ .

## V . C O N C L U S I O N E S

Se ha encontrado que ambos métodos de determinación de boro, por espectrofotometría de absorción molecular uv-visible con curcúmina y por fluorescencia molecular con DBM previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol en MIBC, reúnen las condiciones de sensibilidad, reproductibilidad y precisión para su aplicación a la determinación de boro en material vegetal, si bien el método fluorométrico presenta, evidentemente, una sensibilidad mucho mayor.

La selectividad conseguida mediante el proceso de extracción y la debida a la presencia de ácido fosfórico, hace que ambos métodos puedan ser utilizados en la determinación de boro en otras matrices, como aguas naturales (objeto de otro trabajo posterior), contaminación, boro asimilable en suelos cultivables, muestras biológicas, etc.

Dados los resultados obtenidos se piensa que ambos métodos pueden ser aplicados a estudios del boro en fisiología vegetal y animal,

CUADRO 1. — Valores de B de las muestras analizadas según los dos métodos aplicados y según datos de referencia de M. PINTA.

Planta	Método absorción UV-Visible		Método de fluorescencia		Resultados M. PINTA	
	Coeficiente		Coeficiente		Coeficiente	
	Valor medio $\mu\text{g. g}^{-1}$ de B	de variación %	Valor medio $\mu\text{g. g}^{-1}$ de B	de variación %	Valor medio $\mu\text{g. g}^{-1}$ de B	de variación %
Hevea	60,1	2,4	58,53	6,0	58,86	11,5
Palmera	15,6	4,4	15,65	5,3	14,51	17,2
Eucaliptos	35,5	1,9	35,73	3,8	34,12	11,1
Viña	46,5	2,4	50,45	3,0	49,28	24,0
Naranja	36,2	2,1	38,15	3,4	40,04	11,8
Olivo	19,6	5,4	18,81	3,9	17,91	16,3
Melocotonero	37,1	2,0	38,02	5,2	37,33	13,0
Codia	26,0	3,2	26,02	5,7	25,27	13,0
Maíz	21,2	2,3	23,31	6,0	23,22	15,3
Manzano Cox-Orange	30,6	2,1	31,28	3,3	32,87	13,3
Manzano golden	28,0	2,8	26,25	2,8	28,35	12,6
Algodonero	23,2	5,0	25,26	3,9	24,87	13,0

así como para el abonado de suelos cultivables y para el estudio de la deficiencia de boro en vegetales.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la aplicación a la determinación de boro en material vegetal de dos nuevos métodos, basados en la extracción del ácido bórico con el 2-metil-2,4-pentanodiol en MIBC a partir de soluciones clorhídricas (5 a 6 M. en HCl). Una vez efectuada la extracción, en uno de los métodos se realiza la determinación de boro por espectrofotometría de uv-visible con curcumina en fase orgánica de extracción y en presencia de ácidos fosfórico y acético, con una sensibilidad de  $0,011 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  de boro en la fase orgánica final. En el otro método la determinación de boro se realiza por fluorescencia molecular con dibenzoilmetano como reactivo en la misma fase orgánica procedente de la extracción. La sensibilidad alcanzada en este método es de  $1,09 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  de boro en la fase orgánica final.

Se ha comprobado que en ambos métodos la presencia en solución acuosa de los elementos que pueden encontrarse normalmente en las cenizas de plantas no produce interferencias en la determinación de boro.

Se han analizado doce muestras de hojas de plantas y se ha encontrado que para seis determinaciones de cada muestra por el método de absorción uv-visible con curcumina, el coeficiente de variación no superó el  $\pm 5\%$ . Por fluorescencia molecular para diez determinaciones de cada muestra, el coeficiente de variación no superó el  $\pm 6\%$ .

Por la selectividad, sensibilidad y precisión conseguidas en ambos métodos, se consideran de utilidad para la determinación de boro en material vegetal.

## REFERENCIAS

AZNÁREZ, J., BONILLA, A. y BELARRA, M. A.

- 1979 Determinación de boro por fotometría de llama, previa extracción con 2-metil-2,4-pentanodiol a metil-isobutil-cetona. *Revista de la Academia de Ciencias de Zaragoza*. 34 (1979).



AZNAREZ, J. and BONILLA, A.

- 1979 Determination of boron by fluorescence with dibenzoylmethane, *The Analyst* (en prensa).

AZNAREZ, J., BONILLA, A. y MIR, J. M.

- 1979 Determinación de boro por espectrofotometría de absorción uv-visible con curcúmina, previa extracción. *Revista de la Academia de Ciencias de Zaragoza* (en prensa).

BONNER, J. and VARNER, J. E.

- 1976 Plant Biochemistry. *Academic Press Inc.*, London, 3.<sup>a</sup> edition.

CLINTON, D. E.

- 1974 Determination of boron by atomic-absorption spectrometry, previous extraction. *Science*, **17** (4): 445-47.

ELTON-BOTT, R. R.

- 1976 Determination of boron in plant tissue by atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **6**: 281-4.

PAU, J. M. C., PICKETT, E. E. and KOIRTYOHANN, S. R.

- 1972 Determination of boron in plant by Emission Spectroscopy with nitrous oxide-hydrogen. *The Analyst*, **97**: 860-63.

PINTA, M.

- 1975 Methods de reference pour la determination des elements minéraux dans les vegetaux. *Reviews of the Hungarian Academy of Sciences*, **143**: 148-49.
- 1975 Etalons vegetaux pour l'analyse foliare. *Analisis*, **3**(6), 345-48.
- 1976 4e Colloque International sur le controle de l'Alimentation des plants cultivées. *Rijksuniversiteit confpurelinks 533 B-9000, GENT*, 41-52.

POCHINOS, K. and KRAUSE, M.

- 1960 Determination of boron by UV Spectrometry in plant tissue. *A Chemie analityczna*, **5**: 791-94.

TROKVA, K. and VOKRAL, M.

- 1974 Determination of boron in plant materials by alkaline. *Agrochimica*, **14**: (9), 275-78.

WILLIAMS, D. E. and VLAMIS, I.

- 1961 Boron contamination in furnace dry ashing of plant material. *Anal. Chem.*, **33**: 967-69.