



MARÍLIA ABREU ROCHA

**IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
BORO EM MICROFERTILIZANTES**

LAVRAS – MG

2021

MARÍLIA ABREU ROCHA

**IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
BORO EM MICROFERTILIZANTES**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de
Engenharia Química, para a obtenção
do título de Bacharel.

Prof (a). Dr (a). Lidja Dahiane Menezes Santos Borél

Orientador (a)

Prof (a). Dr (a). Elisângela Jaqueline Magalhães

Coorientador (a)

LAVRAS – MG

2021

MARÍLIA ABREU ROCHA

**IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
BORO EM MICROFERTILIZANTES**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de
Engenharia Química, para a obtenção
do título de Bacharel

APROVADA em 19 de maio de 2021

Prof (a). Dr (a). Cristiane Alves Pereira UFLA

Prof (a). Dr (a). Natália Maira Braga Oliveira UFLA

Prof (a). Dr (a). Lidja Dahiane Menezes Santos Borél

Orientador (a)

Prof (a). Dr (a). Elisângela Jaqueline Magalhães

Coorientador (a)

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que me deu e por me dar forças para nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus amados pais, Maria de Fátima e Antônio e meu irmão Rafael por acreditarem em mim e não medirem esforços para me ajudar a conquistar os meus sonhos. Vocês foram fundamentais nessa jornada. Ao meu namorado Marcos por sempre me apoiar e fazer acreditar em mim mesma. Aos amigos que conquistei durante essa jornada vocês não imaginam o quanto foram essenciais no meu processo de amadurecimento pessoal e na minha vida. A empresa Extrativa Fertilizantes S/A pela oportunidade de realização dos experimentos nesse trabalho e toda a equipe do laboratório que prestou todo o apoio necessário. Agradeço a minha coorientadora Jaqueline por todo o esforço e disposição para construção desse trabalho e a minha orientadora Lidja pelo apoio prestado.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a implementação de um método espectrofotométrico utilizando a azometina-H para quantificar o teor de boro em microfertilizantes. Para isso construiu-se uma curva analítica, de acordo com instruções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Fez-se uma comparação do método espectrofotométrico da azometina-H com um método por espectrometria de absorção de chama (FAAS) pela análise de soluções de ácido bórico nas concentrações de 1, 5, 10 e 15% de boro. O método da azometina-H apresentou menor assertividade na concentração de 1 % m/m do analito, quando comparado aos teores mais altos, enquanto que a FAAS apresentou desvio padrão relativo superior a 5% em quase todos os níveis de concentração avaliados, o que mostra menor predição deste método instrumental em relação ao método espectrofotométrico. Para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos aplicou-se o teste F, indicando que as variâncias não diferiram entre si e, em seguida, através do teste t, com um nível de significância de 5%, constatou-se que ambos os métodos apresentaram médias próximas entre si. Análises de microfertilizantes com teores distintos foram realizadas em triplicata, com duplicata de análise espectrofotométrica. Os resultados obtidos mostraram satisfatórias precisão e exatidão, uma vez que desvio padrão relativo foi inferior a 5% e houve coerência entre os teores de boro determinados pelo método da azometina-H e o teor conhecido da amostra. O resultado obtido foi diferente entre os experimentos realizados, indicando a possibilidade de interferências causadas por substâncias que compõem os microfertilizantes utilizados. Para verificar se o método foi devidamente implementado, como também certificar a sua eficiência, alguns ensaios de validação foram realizados. Nesses ensaios foi possível constatar a existência do efeito de matriz, avaliar o teor de uma amostra real pela construção de uma curva analítica por adição de padrão e estimar os limites de quantificação e de detecção, que foram de 0,008 e 0,0024 %, m/m, respectivamente. Pelos resultados obtidos, o método espectrofotométrico da azometina-H mostrou-se confiável podendo, após uma validação completa, ser empregado na rotina do laboratório da empresa Extrativa Fertilizantes para análises de controle de qualidade do processo de produção de microfertilizantes.

Palavras-chave: Fertilizantes. Azometina-H. Método espectrofotométrico. Método analítico. Curva analítica

ABSTRACT

This work aimed to implement a spectrophotometric method using azomethine-H to quantify the boron content in microfertilizers. For this purpose, an analytical curve was constructed, according to instructions from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). A comparison was made between the spectrophotometric method of azomethine-H and a method by flame absorption spectrometry (FAAS) by analyzing boric acid solutions in concentrations of 1, 5, 10 and 15% of boron. The azomethine-H method showed less assertiveness in the concentration of 1% m / m of the analyte, when compared to the higher levels, while the FAAS presented a relative standard deviation greater than 5% in almost all the concentration levels evaluated, which shows less prediction of this instrumental method in relation to the spectrophotometric method. To compare the results obtained by the two methods, the F test was applied, indicating that the variances did not differ from each other, and then, through the t test, with a significance level of 5%, it was found that both methods presented averages close to each other. Analyzes of microfertilizers with different levels were performed in triplicate, with duplicate spectrophotometric analysis. The results obtained showed satisfactory precision and accuracy, since the relative standard deviation was less than 5% and there was consistency between the boron levels determined by the azomethine-H method and the known content of the sample. The result obtained was different between the experiments carried out, indicating the possibility of interferences caused by substances that make up the micro-fertilizers used. To verify that the method was properly implemented, as well as to certify its efficiency, some validation tests were carried out. In these tests it was possible to verify the existence of the matrix effect, to evaluate the content of a real sample by constructing an analytical curve by adding a standard and to estimate the limits of quantification and detection, which were 0.008 and 0.0024%, m / m, respectively. From the results obtained, the spectrophotometric method of azomethine-H proved to be reliable and, after a complete validation, it can be used in the routine of the laboratory of the company Extrativa Fertilizantes for quality control analysis of the microfertilizer production process.

Keywords: Fertilizers. Azomethine-H. Spectrophotometric method. Analytical method. Analytical curve

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Deficiência de boro em folhas de soja.	13
Figura 2 – Deficiência de boro no fruto do morango.	13
Figura 3 – Reação de condensação da azometina-H.	17
Figura 4 – Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro	18
Figura 5 – Desvios da Lei de Beer.....	20
Figura 6 – Esquema de funcionamento do espectrômetro de absorção atômica	21
Figura 7 – Região crítica do teste F.	29
Figura 8 – Padrões de comportamento do gráfico de resíduos.	32
Figura 9 – Soluções utilizadas para construção da curva analítica de boro.....	35
Figura 10 – Soluções utilizadas para análise espectrofotométrica.	38
Figura 11 – Curva analítica de Boro.....	43
Figura 12 – Resíduos versus valor observado para as análises de boro em microfertilizantes pelo método de azometina-H.....	48
Figura 13 – Gráfico de probabilidade normal para as análises de boro em microfertilizantes pelo método de azometina-H.....	49
Figura 14 – Curva analítica em puro solvente e curva analítica matrizada.	50
Figura 15 – Curva analítica matrizada e curva analítica em puro solvente sem o último nível de concentração	51
Figura 16 – Curva analítica por adição de padrão.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Teor de Boro e desvio padrão relativo obtidos das análises de solução de ácido bórico pelo método da azometina-H.	44
Tabela 2 — Teor de Boro e desvio padrão relativo obtidos das análises de soluções de ácido bórico por espectrometria de absorção atômica de chama.	45
Tabela 3 — Teor de Boro e desvio padrão relativo das análises de 9 amostras de microfertilizantes pelo método da azometina-H.	46
Tabela 4 — Quadro da ANOVA com dois fatores para avaliação dos resultados das análises de fertilizantes pelo método da azometina-H.	48
Tabela 5 — Absorbância e concentração pela curva por adição de padrão.	54
Tabela 6 — Limites de quantificação estimados.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.....	22
Quadro 2 – Quadro da ANOVA two way.....	29
Quadro 3 – Massa de amostra e diluição do extrato para análise de boro em balão volumétrico de 100 mL.....	35

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Determinação de Boro em Fertilizantes	16
2.1.1	<i>Determinação de Boro pelo Método da Azometina-H</i>	16
2.2	Espectrofotômetro UV / Visível	18
2.2.1	<i>Lei de Lambert-Beer</i>	19
2.2.2	<i>Desvios da Lei de Beer</i>	19
2.3	Espectrometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS)	20
2.4	Validação da Metodologia Analítica	22
2.4.1	<i>Seletividade e Efeito de Matriz</i>	24
2.4.2	<i>Linearidade e Faixa de Trabalho</i>	24
2.4.3	<i>Limite de Quantificação</i>	25
2.4.4	<i>Limite de Detecção</i>	25
2.4.5	<i>Precisão e Exatidão</i>	26
2.5	Análise de Variância (ANOVA)	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Reagentes e Materiais	33
3.2	Preparo de Soluções	33
3.2.1	<i>Solução de Azometina – H</i>	33
3.2.2	<i>Solução Padrão de Boro a 200 mg/L</i>	34
3.2.3	<i>Solução Padrão de Boro a 3 mg/L</i>	34
3.2.4	<i>Solução Tampão Complexante</i>	34
3.2.5	<i>Preparo de soluções para construção da Curva Analítica de Boro</i>	35
3.3	Preparo das Amostras de Fertilizantes para Análise Química	35
3.4	Preparação das Soluções para Análise Espectrofotométrica	37
3.5	Análise Espectrofotométrica	38
3.6	Constante de Correlação K	39
3.7	Determinação do Teor de Boro	39
3.8	Análises por absorção atômica de chama (FAAS)	40

3.9	Tratamento estatístico dos resultados	40
3.10	Validação do Método	41
3.10.1	<i>Procedimento para Determinação dos Limites de Quantificação (LQ) e Limites de Detecção (LD)</i>	41
3.10.2	<i>Procedimento para Análise do Efeito de matriz</i>	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Implementação do Método Oficial do MAPA (2017)	43
4.2	Comparação de Métodos	44
4.3	Análise de Microfertilizantes pelo Método da Azometina-H	46
4.4	Validação de Método	50
4.4.1	<i>Avaliação da Seletividade e Efeito de Matriz</i>	50
4.4.2	<i>Determinação do Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)</i>	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar mundial depende do uso adequado dos fertilizantes minerais e essa dependência inevitavelmente, aumentará no futuro. Segundo Reetz (2017), a produção mundial dos alimentos básicos necessários hoje cairia pela metade sem uso de fertilizantes, de modo que mais áreas florestais teriam que ser convertidas em áreas de cultivo.

O setor agrícola brasileiro é o maior cliente da cadeia de fertilizantes no Brasil. Segundo Cruz et al. (2017), entre 2000 e 2015 o consumo cresceu 87% no país, contribuindo para o aumento da produção de grãos, no mesmo período, de 150%. Entretanto, a produção nacional de fertilizantes é historicamente inferior à sua demanda, o que implica no aumento da dependência em relação às importações ano após ano. Em 2015, por exemplo, cerca de 65% do consumo total de fertilizantes foi suprido por importações.

Os fertilizantes favorecem o aumento da produção agrícola, contanto que sejam aplicados da forma correta e em quantidades recomendadas para suprir as necessidades nutricionais do solo e da cultura. Existem 17 nutrientes essenciais para o crescimento das culturas, sendo três deles: carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), fornecidos pelo ar e pela água. Os três macronutrientes primários, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são, principalmente, fornecidos pelo solo, mas deficiências no solo e remoção pelas culturas devem ser repostas via fontes suplementares, principalmente com fertilizantes. Os macronutrientes secundários, enxofre (S), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) não são menos essenciais, mas são, usualmente, exigidos em menor quantidade. Finalmente, os micronutrientes, boro (B), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu), molibdênio (Mo), cloro (Cl) e níquel (Ni) são necessários em pequenas quantidades, mas tem funções essenciais como catalisadores nos processos metabólicos para o crescimento e desenvolvimento das culturas ou exercem outras funções chave (REETZ, 2017).

Resultados oficiais da Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA) apontam um consumo do micronutriente boro de 10.992 toneladas no ano de 2020, indicando um aumento de 30% do consumo em 2020 em relação ao ano de 2009.

De acordo com Mengel e Kirkby (2001) o boro é um elemento semi-metálico essencial ao pleno desenvolvimento vegetal. Na natureza, o boro é encontrado combinado com o oxigênio para a formação de compostos covalentes, principalmente nas formas de ácido bórico (H_3BO_3), bórax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), colemanita ($Ca_2B_6O_{11} \cdot 5H_2O$) e ulexita ($NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$) (PERDONÁ, CARVALHO e RIELLA, 2001).

De acordo com Soares, Alleoni e Casagrande (2005), devido à neutralidade elétrica de sua forma predominante, H_3BO_3 , o boro é um elemento extremamente móvel no solo e por isso é facilmente lixiviado. Almeida (2015) destaca que a deficiência de boro é muito comum em regiões tropicais devido à alta pluviosidade nessas latitudes. No entanto, a disponibilidade de boro também diminui significativamente em condições de seca, pela queda na difusão e fluxo de massa ou polimerização do ácido bórico. O teor de boro decresce com o aumento do pH, principalmente em solos mais alcalinizados e com alto teor de argilas.

Solos com pouca disponibilidade de boro podem acarretar sérios problemas em plantações, comprometendo a produtividade de várias espécies de plantas. Segundo Malavolta e Kliemann (1985), nas folhas novas de plantas com deficiência de boro aparecem áreas aquosas que se tornam translúcidas com o amadurecimento. Além disso, as nervuras ficam salientes e rachadas ocorrendo encurvamento e queda das folhas. Há encarquilhamento de folhas maduras, pontuações amareladas nas folhas novas, morte da gema terminal e ausência de flores. Anderson (1993) destaca ainda que os sintomas mais característicos de falta de boro são refletidos nos frutos e que a correção é rápida, com aplicações via solo ou folhas. As Figuras 1 e 2 apresentam sintomas da deficiência de boro nas folhas da soja e no fruto do morango, respectivamente.

Figura 1 — Deficiência de boro em folhas de soja.



Fonte: Almeida (2015).

Figura 2 — Deficiência de boro no fruto do morango.



Fonte: Almeida (2015).

Apesar disso, a toxidez de boro é tão grave quanto sua falta, manifestando-se nas folhas por um amarelecimento das extremidades que se estende para as margens, podendo ocorrer formação de resinas na fase inferior e acentuada queda de folhas e morte de plantas (RODRIGUEZ, 1991).

Dessa maneira, é possível compreender a importância de se realizar um manejo correto dos solos para plantio. Isso pode ser feito a partir da análise e correção do solo com o uso de fertilizantes.

A Extrativa Fertilizantes é uma empresa situada no município de São Tiago, Minas Gerais, que produz mais de 100 tipos microfertilizantes contendo boro em suas formulações. Esses produtos podem conter, além de boro (B), cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), enxofre (S), silício (Si) e zinco (Zn).

A matéria-prima empregada na fabricação de microfertilizantes a base de boro na Extrativa Fertilizantes é a ulexita ($\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), também chamada de borato de cálcio e sódio. Após processada, a ulexita tem potencial para ser utilizada como fertilizante de boro, além disso, esse material apresenta vantagens em relação a outras fontes desse nutriente, como por exemplo, o ácido bórico. De acordo com Veloso (2021), essas vantagens são: a maior dificuldade desse material ser lixiviado em relação às outras fontes de boro e a diminuição de riscos de toxidez por superdosagem de boro devido a sua menor solubilidade.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dois métodos analíticos são aplicados oficialmente para a confirmação dos teores de Boro em fertilizantes. Estes métodos são: método volumétrico do D-manitol (D-sorbitol) e o método espectrofotométrico da azometina-H (BRASIL, 2017). O primeiro método apresenta grande precisão e exatidão, porém demanda de longo tempo de análise, além de alto consumo de reagentes. Além do custo envolvido, considerando também os princípios da Química Verde, o método espectrofotométrico da azometina-H mostra-se mais vantajoso para o controle de qualidade do processo de produção de microfertilizantes.

Diante deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi a implementação de um método espectrofotométrico utilizando a azometina-H para quantificar o teor de boro em microfertilizantes produzidos na Extrativa Fertilizantes. Para isso, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Construção de uma curva analítica para quantificação de boro em espectrofotômetro UV/Visível;
2. Testar o método espectrofotométrico em soluções de ácido bórico de diferentes concentrações;
3. Comparar os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico com um método por espectrometria de absorção atômica de chama.
4. Aplicar o método espectrofotométrico em amostras de microfertilizantes comerciais.

5. Realizar alguns ensaios de validação para avaliar eficiência do método analítico na rotina do laboratório.

Com isso, espera-se contribuir com a padronização dos procedimentos adotados na indústria com o uso de uma metodologia segura e que proporciona valores com alta precisão e exatidão para os teores de boro nos microfertilizantes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Determinação de Boro em Fertilizantes

Para determinação de boro, podem ser utilizados diversos métodos analíticos. Dentre eles, se destacam os métodos espectroscópicos, que são baseados na medida da energia eletromagnética emitida ou absorvida por moléculas ou espécies atômicas de interesse. De acordo com Skoog (2015), tais métodos são classificados segundo a região do espectro eletromagnético envolvido na determinação, ou seja, raios γ , raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelho (IV), microondas e radiofrequência (RF).

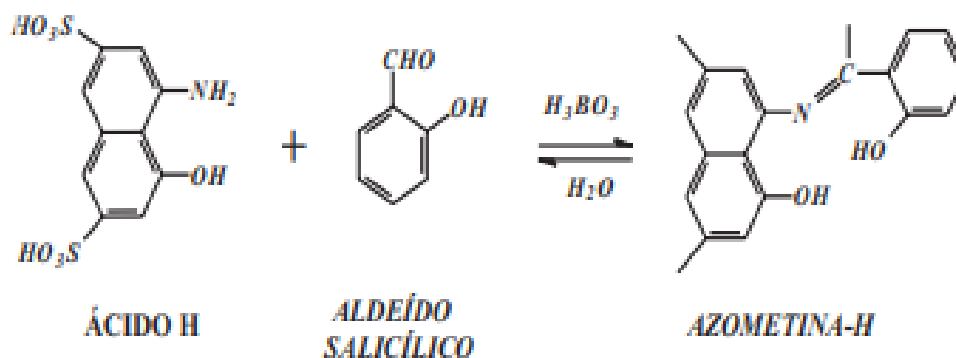
Os métodos espectroscópicos atômicos são considerados rápidos, convenientes e, em geral, altamente seletivos. Dentre esses, tem-se a Espectrometria de Absorção Atômica (AAS, do inglês: *Atomic Absorption Spectrometry*) que é um método simples, capaz de determinar quantitativamente e qualitativamente a presença de metais, mas que pode apresentar algumas interferências espectrais e não-espectrais, o que gera erros nas determinações do analito considerado. Além disso, essa metodologia ainda não é aceita pelo MAPA.

2.1.1 Determinação de Boro pelo Método da Azometina-H

Segundo Soares (2020), a determinação de boro pelo método da azometina-H se baseia na formação de um quelato do borato com a azometina-H que, sob condições controladas, permite a quantificação do boro por espectrofotometria UV-visível em comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) igual a 420 nm.

Em solução aquosa, a azometina-H se dissocia em ácido 4 – amino – 5 hidroxí – 2,7 – naftalenodissulfônico, conhecido como ácido H, e aldeído salicílico como mostrado na reação inversa representada na Figura 3. O ácido bórico atua como catalisador da reação direta, de condensação. Assim, na presença de ácido bórico, o equilíbrio da reação é deslocado para a direita, o que gera um aumento na concentração de azometina-H. O resultado da reação (Figura 3) é uma solução de coloração amarelada, cuja intensidade aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de boro na amostra.

Figura 3 – Reação de condensação da azometina-H.



Fonte: Chaves, et al. (2006).

Para uma boa reprodutibilidade dos resultados a utilização do método espectrofotométrico empregando a azometina-H requer alguns cuidados especiais. Esses cuidados se referem ao pH, a temperatura e ao armazenamento da solução de azometina-H.

O controle do pH é promovido pela presença de uma solução tampão complexante. O pH do meio reacional deve ser o mesmo tanto para a solução da amostra como para soluções que servirão para a construção da curva analítica. Silva e Graner (1996) recomenda a utilização de solução tampão complexante com pH em torno de 5,5.

Capelle (1961) observou que até aproximadamente 25°C a intensidade de cor do complexo boro-azometina, sendo mantidas constantes todas as outras variáveis, incluindo a concentração de boro, permanece praticamente a mesma. Em altas temperaturas, a intensidade da cor aumenta de forma considerável. Dessa forma, recomenda-se que a construção da curva padrão e as análises das amostras sejam realizadas em temperatura constante, sendo essa temperatura de aproximadamente 22°C.

As soluções de azometina-H devem ser preparadas no mesmo dia com reagentes de qualidade comprovada. Além disso, essas soluções devem ficar armazenadas em frasco escuro e ambiente fresco. De acordo com Soares (2020), o ácido ascórbico faz com que a solução de azometina-H seja mais estável, porém o mesmo, na presença de oxigênio e de um catalisador se oxida tornando-se o ácido dehidroascórbico. Sendo assim, o armazenamento dessas soluções por pequenos períodos como até três dias, pode comprometer os resultados.

Segundo Ferreira et al. (2002), a determinação de boro pelo método da azometina-H é simples, é precisa e, além disso, não sofre interferências da maioria dos íons presentes nas

concentrações usuais em extratos de solos. Sendo assim, esse método apresenta grande aceitação quando comparado aos demais.

Apesar dessas vantagens, o método é suscetível à presença de matéria orgânica dissolvida ou em suspensão (GUPTA, 1979a) e à presença de altos teores de Fe extraídos por ácidos fortes diluídos (ZARCINAS, 1995). Uma vez que diversos outros elementos devem estar presentes na amostra de microfertilizante, a presença de interferentes nas análises deve ser investigada.

2.2 Espectrofotômetro UV-Visível

O espectrofotômetro UV-Visível é um equipamento utilizado para se obter informações sobre a absorção de uma amostra previamente preparada. Como pode ser visto na Figura 4, posicionando a cubeta com a amostra no caminho óptico do aparelho, a luz emitida por uma fonte de radiação passa por um colimador a fim de direcionar e suavizar feixes de radiação. Esses feixes são direcionados a um monocromador, que seleciona o comprimento de onda que incidirá sobre a amostra. Quando o feixe de luz monocromática atinge a solução da amostra, parte dessa luz é absorvida por essa solução e parte é transmitida. A redução na intensidade luminosa, devido à diferença entre a absorção e transmissão, é medida por um detector, o qual gera um sinal elétrico que é amplificado e processado por um leitor, que retorna como resposta o valor da absorbância, que é proporcional à concentração da substância absorvente existente na cubeta.

Figura 4 — Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro



Fonte: Adaptado de Kasvi (2018).

Segundo Rosa, Gauto e Gonçalves (2013), a transmitância é a fração de energia luminosa que atravessa uma determinada espessura de um material sem ser absorvida e a absorbância

representa a fração de energia luminosa que é absorvida por uma determinada espessura de material.

De acordo com Benzan (2010), a intensidade da luz antes de passar pela amostra é simbolizada por I_0 (intensidade da radiação incidente), e a intensidade da luz depois de passar pela amostra é simbolizada por I (intensidade transmitida pela amostra). A transmitância da amostra é definida pela razão (I/I_0), a qual normalmente é expressa em porcentagem de transmitância (%T).

2.2.1 Lei de Lambert-Beer

A Lei de Lambert-Beer representa quantitativamente como a grandeza da atenuação depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção. À medida que a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, ocorre um decréscimo de intensidade na proporção em que o analito é excitado. Para uma solução de analito de uma determinada concentração, quanto maior o comprimento do caminho ótico, mais centros absorventes estarão no caminho, e maior será a atenuação. De forma semelhante, para um dado caminho ótico, quanto maior a concentração de absorventes, mais forte será a atenuação (SKOOG, 2015)

Esta lei relaciona a transmissão de luz e a espessura da camada do meio absorvente. Para se determinar de maneira quantitativa a concentração de substâncias em soluções que absorvem a radiação, utiliza-se a relação expressa pela Equação (1).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot C \cdot L \quad (1)$$

em que A é a absorbância medida, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade transmitida pela amostra, ϵ é a constante de absorvidade que varia de acordo com a substância, L é o caminho óptico pela amostra e C é a concentração da substância em (mg/L).

2.2.2 Desvios da Lei de Beer

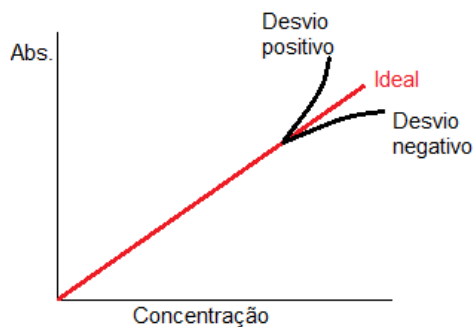
Para aplicação da Lei de Lambert-Beer, também conhecida como Lei de Beer, as reações colorimétricas devem seguir algumas condições restritas, são elas:

1. A luz utilizada é aproximadamente monocromática;
2. As soluções a serem analisadas devem apresentar baixas concentrações;
3. A mesma solução deve conter apenas uma substância absorvente de luz.

A Lei de Beer propõe que a curva de absorvância (A) versus concentração do analito seja linear. A partir da Figura 5 observa-se que em uma determinada concentração a curva começa a apresentar uma relação não linear entre a A e a concentração da espécie. Dessa maneira, a partir deste ponto a Lei de Beer não é mais válida.

Segundo Skoog (2015), esses desvios podem ser chamados de desvios reais e desvios aparentes. Os desvios reais são os desvios verdadeiros, que limitam a aplicação da Lei de Beer, na qual uma das limitações desta lei é descrever o modo como um meio que apresenta baixas concentrações de analito se comporta, já os desvios aparentes estão relacionados às limitações do instrumento utilizado para a medida da absorvância e também a fenômenos químicos que podem ocorrer nas soluções a serem analisadas.

Figura 5 — Desvios da Lei de Beer



Fonte: Do autor (2021).

2.3 Espectrometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS)

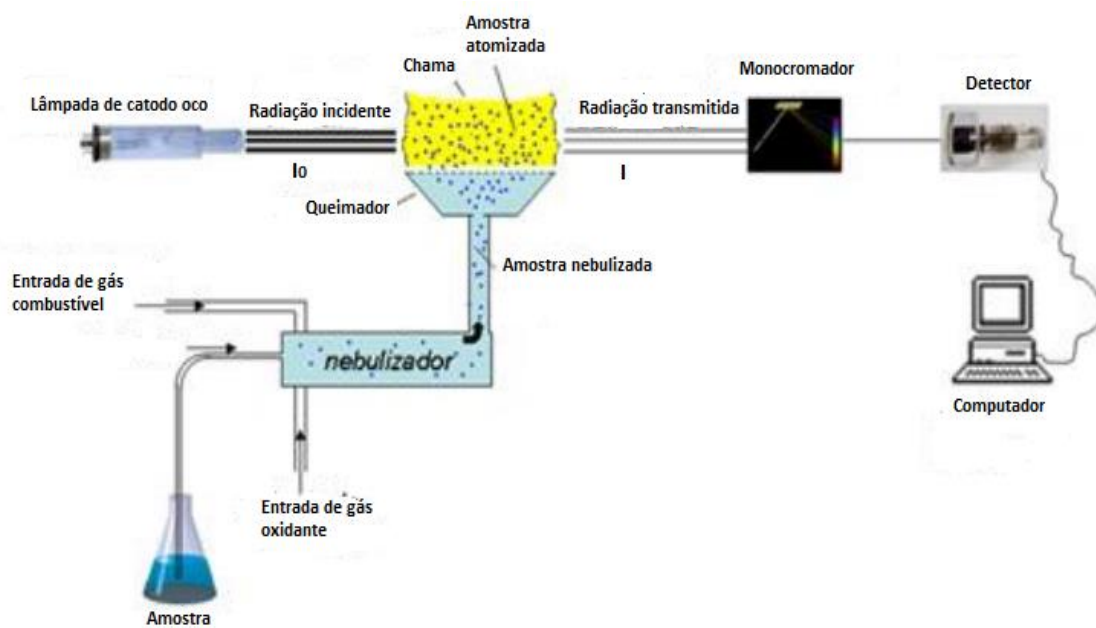
De acordo com Krug, et.al (2004), o princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental. Nessa metodologia, esse fenômeno é utilizado para determinação quantitativa de elementos.

A espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS, do inglês: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é a mais empregada em análises elementares em níveis de mg/L e baseia-se na atomização do metal de interesse em uma chama de óxido nitroso com acetileno e ar, no caso do boro. De acordo com Welz e Sperling (1999), o princípio de funcionamento da técnica baseia-

se na absorção de radiação em um comprimento de onda específico por átomos gasosos de um determinado elemento no estado fundamental.

Na FAAS, os brancos, soluções analíticas e amostras são aspirados e passam por um sistema de nebulização, em que as soluções são convertidas em um aerossol, que se mistura com os gases combustível e oxidante e é transportado até a chama ocorrendo a produção de átomos no estado fundamental que absorvem a energia passando para um estado de excitação. Na Figura 6, é apresentado o esquema de funcionamento do espectrômetro de absorção atômica.

Figura 6 — Esquema de funcionamento do espectrômetro de absorção atômica



Fonte: Adaptado de JMGAV (2013).

Na FAAS, geralmente é realizada uma calibração inicial do equipamento com algumas soluções com concentrações conhecidas em uma faixa de trabalho pré-estabelecida, também chamadas de soluções padrão. Segundo Chui, Zucchini e Lichtig (2001), plotando-se as concentrações conhecidas utilizadas x_i , contra as respostas do instrumento y_i , é possível observar correlações lineares. Estabelece-se uma curva de calibração que representa da melhor maneira possível os conjuntos de pontos (x_i, y_i) obtidos. Representando uma relação linear como $y = bx + a$, valores para a e b são obtidos através do método numérico dos mínimos quadrados, que

é um modelo matemático de correlação entre os valores numéricos de x e y. O coeficiente de correlação r é obtido a partir da Equação (2).

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})}{(n-1) \times S_x \times S_y} \quad (2)$$

em que S_x e S_y são as variâncias dos valores de x_i e y_i . O valor do coeficiente de correlação pode variar entre -1 e +1. Para critério de linearidade, o valor desse coeficiente deve estar acima de 0,999.

Segundo Welz e Sperling (1999, apud BECLIN, 2013), a espectrometria de absorção atômica sofre menos interferências espectrais quando comparada a outras técnicas na determinação do boro. Porém, devido à formação de óxidos e carbetos de boro altamente estáveis, apenas uma pequena quantidade do elemento é atomizada, e a sensibilidade da técnica, seja no modo chama ou forno de grafite, é baixa, sendo o boro um dos últimos elementos em escala de sensibilidade na espectrometria de absorção atômica.

2.4 Validação da Metodologia Analítica

Para que um método analítico seja desenvolvido, adaptado ou implementado é necessário a realização da validação de método que consiste, basicamente, no processo de uma avaliação da sua eficiência na rotina do laboratório.

Segundo Brito et al. (2003), o método só é validado quando suas características estão de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. A validação deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito.

Para validação de uma metodologia analítica, destaca-se a realização de comparação de resultados por meio de um método de referência validado. O objetivo é estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, avaliar a precisão do método em processo de validação com o de referência. Neste caso, recomenda-se a realização de análises em replicata sobre as mesmas amostras nos dois métodos, sendo essas análises realizadas em todo o intervalo de concentração em que se pretende validar o método. Para análise de dados recomenda-se a realização de teste de hipóteses, primeiramente aplicando-se o teste F para avaliar se as variâncias estão estatisticamente iguais ou diferentes. O teste t (Student) é utilizado em seguida

para verificar se as médias dos resultados de dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais (INMETRO, 2016).

Há várias normas e sistemas de qualidade que mostram a importância da validação de métodos analíticos e documentação para validação, com o objetivo de se obter resultados confiáveis e adequados.

De acordo com o INMETRO (2016), para confirmar se os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar métodos criados, ou seja, métodos que foram desenvolvidos ou implementados pelo próprio laboratório, sendo essa validação suficientemente abrangente para atender as necessidades de uma determinada aplicação ou área da aplicação. Os resultados obtidos e o procedimento utilizado devem ser registrados. É necessário a confecção de um relatório de validação, no qual o processo de validação deve estar descrito. Os ensaios devem ser realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados.

Os parâmetros de desempenho devem estar claramente descritos no procedimento e relatório de validação. O Quadro 1 apresenta esses parâmetros que devem ser calculados de acordo com o INMETRO (2016).

Quadro 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo de Ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	√	√
Linearidade /faixa de trabalho /Faixa linear de trabalho/ Sensibilidade		√
Limite de detecção	√	√
Limite de quantificação		√
Tendência / Recuperação		√
Precisão		√
Robustez	(*)	(*)

(*) Parâmetro opcional.

Fonte: INMETRO, (2016).

2.4.1 *Seletividade e Efeito de Matriz*

A seletividade representa a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Matriz ou matriz de amostra são todos os demais componentes da amostra na qual o analito está contido.

A seletividade deve ser avaliada para que o sinal detectado pelo equipamento não seja oriundo de outros efeitos, senão do analito. Segundo o INMETRO (2016), a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente a magnitude desse efeito também pode depender da concentração. Logo, no estudo da seletividade é necessário verificar também a existência do efeito de matriz. INMETRO (2016)

O efeito de matriz pode ser avaliado preparando-se duas curvas analíticas contendo a mesma adição de analito em cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra, sendo essa amostra a que contém a menor concentração possível de analito e a outra curva não inclui a matriz de amostra. De acordo com o INMETRO (2016), devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas em cada nível. Nesse estudo, aplica-se um teste t para inclinação das curvas, cuja hipótese é que a matriz não interfere na inclinação da curva analítica. Quando as inclinações não se diferem significativamente não há efeito de matriz. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz. Os dados dessa análise podem ser utilizados para o estudo da linearidade.

2.4.2 *Linearidade e Faixa de Trabalho*

A linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Já a faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração do analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005)

Segundo o INMETRO (2016), a linearidade é formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A Equação (3) apresenta a equação da reta que relaciona as variáveis absorvância (y) e concentração (x).

$$y = bx + a \quad (3)$$

em que, o coeficiente linear a representa a interseção com o eixo y quando x é igual a zero e b é o coeficiente angular que representa a inclinação da curva analítica, ou seja, a sua sensibilidade. Esses coeficientes são calculados através do método de regressão linear.

Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de outliers para cada nível de concentração e a homoscedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados (INMETRO, 2016).

De acordo com o Manual de Garantia de Qualidade Analítica do MAPA (2015), para avaliação da linearidade (quando aplicável ao método), inicialmente deve ser definida a faixa de trabalho. Esta faixa já pode estar definida pelo próprio método normalizado ou pode ser definida pelo analista, com base na faixa de concentração do analito que se espera encontrar ou avaliar.

2.4.3 Limite de Quantificação

Limite de quantificação (LQ) do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, sob determinadas condições experimentais. É calculado como a concentração do analito para o qual a relação sinal/ ruído é de 10:1 (BARROS, 2002).

O limite de quantificação pode ser estimado de três formas diferentes, são elas: a partir da curva analítica (Equação 4), a partir da média e desvio padrão do branco, em que o branco é a solução sem a presença do analito, (Equação 5) e a partir do branco da amostra com a adição da menor concentração aceitável do analito (Equação 6).

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (4)$$

$$LQ = \bar{X} + 10 \cdot s \quad (5)$$

$$LQ = 0 + 10 \cdot s \quad (6)$$

em que s é o desvio padrão amostral dos brancos da amostra, b é a inclinação da curva analítica e \bar{X} é a média dos valores dos brancos da amostra.

2.4.4 Limite de Detecção

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais.

Existem muitos critérios para definição do limite de detecção. Para métodos analíticos instrumentais, o critério adotado é a relação sinal/ruído de 3:1 (BARROS, 2002).

De modo que, o limite de detecção (LD) pode ser determinado a partir do limite de quantificação (LQ) por meio da Equação 7.

$$LD = \frac{LQ}{3,3} \quad (7)$$

2.4.5 Precisão e Exatidão

De acordo com definição do ICH (2005), a precisão de um método analítico expressa a proximidade (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de múltiplas amostragens da mesma amostra homogênea sob condições pré-determinadas. A precisão deve ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições operacionais ao longo de um curto intervalo de tempo. A repetibilidade também é denominada uma precisão intra-ensaio (ICH, 2005).

Segundo o ICH (2005), a precisão intermediária expressa variações dentro dos laboratórios, como por exemplo, dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, entre outros.

Para análise da precisão intermediária, deve-se realizar no mínimo dois estudos de repetitividade (considerando todas as condições diferentes existentes no laboratório).

De acordo com o ICH (2005), a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios. Essa análise não é requerida para submissão de uma validação analítica, mas deve ser levada em consideração para padronização de procedimentos analíticos.

O coeficiente de variação por nível de concentração deve ser calculado e, se a amostra apresenta concentração conhecida do analito de interesse, pode-se avaliar a exatidão pela diferença percentual entre o valor predito e a média dos resultados do estudo de precisão. O coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado a partir da Equação 8.

$$CV = DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (8)$$

em que *DP* é o desvio padrão e *CMD* é a concentração média determinada.

A exatidão pode ser avaliada a partir do erro relativo (ER), expresso em percentagem pela Equação 9.

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100 \quad (9)$$

em que, X_{lab} representa o valor obtido experimentalmente ou a média aritmética dos valores obtidos e X_v é o valor aceito como verdadeiro (INMETRO, 2016). Para critério de aceitabilidade o MAPA (2015) propõe: “Quando for avaliada a exatidão, a diferença percentual do valor predito (X_{lab}) com a média dos resultados do estudo de precisão (X_v) deve ser $\leq 20\%$ ”.

2.5 Análise de Variância (ANOVA)

Em um estudo experimental, há dois tipos de erros associados à medida: o erro sistemático e erro aleatório. O primeiro é a parcela previsível e tem como característica afetar os resultados experimentais sempre na mesma direção, seja para mais ou para menos. Os erros sistemáticos podem ser identificados e eliminados. Já o erro aleatório é imprevisível e tem origem de variações espaciais ou temporais, e diferente do erro sistemático, não pode ser eliminado. Em seu trabalho, Barros, Scarminio e Bruns (2001) ressaltam a importância de réplicas para avaliar o erro associado às medidas em um estudo científico. Além disso, a repetição aumenta a probabilidade de a média das medidas se aproximar da média populacional conforme o teorema do limite central, que comprova que o erro do valor médio é menor que o erro de uma observação individual.

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística usada para verificar se as diferenças observadas na média de uma variável resposta do experimento decorrem da mudança de nível de um fator ou se podem ser atribuídas ao erro da medida. Isso é feito examinando-se a variabilidade total dos dados coletados.

Um fator é uma variável independente do estudo que pode ser medida e controlada e que corresponde a uma possibilidade de influência no objeto de pesquisa. Para avaliar a resposta quando há somente um fator de influência utiliza-se a ANOVA unidirecional ou de fator único (*one way ANOVA*), quando há duas variáveis independentes usa-se a ANOVA bidirecional ou de dois fatores (*two way ANOVA*).

As observações podem ser descritas usando o modelo estatístico linear apresentado por Montgomery, Runger e Hubele (2009) conforme a Equação (10).

$$y_j = \eta_j + \varepsilon_j \quad (10)$$

em que y_j é uma variável aleatória denotando a (j)ésima observação, ε_j é o componente de erro que representa o desvio aleatório da média e η_j é a média dos tratamentos podendo ser calculada a partir da Equação (11).

$$\eta_j = \eta + \tau_j \quad (11)$$

em que η é um parâmetro comum a todos os tratamentos denominado média global e τ_j é um parâmetro associado ao j-ésimo tratamento, chamado j-ésimo efeito de tratamento.

A análise de variância divide a variabilidade total nos dados descrita pela soma total dos quadrados dos desvios em relação à média da amostra em duas parcelas: uma relativa ao tratamento e outra relativa ao erro. Então se faz testes de hipóteses, no qual a hipótese nula (H_0) pressupõe a igualdade das médias dos tratamentos e a hipótese alternativa (H_1) pressupõe que pelo menos dois tratamentos apresentam médias diferentes, conforme as Equações 12 e 13, respectivamente.

$$H_0: n_1 = n_2 = n_3 = \dots = n_j \quad (12)$$

$$H_1: \text{pelo menos dois dos } n'_j\text{s são diferentes} \quad (13)$$

Segundo Freire (2021), um intervalo de confiança para um determinado parâmetro da população mostra um intervalo de valores do verdadeiro parâmetro da população compatíveis com os dados da amostra, com um certo nível de confiança. O intervalo de confiança é dado por $(1-\alpha)$ em que α é o nível de significância e indica a probabilidade de rejeição da hipótese nula quando ela é verdadeira.

As probabilidades, sob a hipótese nula, de se obter um valor igual ou maior que o calculado para a estatística do teste ou de se obter um valor igual ou menor do que o calculado para a estatística do teste a partir da amostra são a base para obter o que se denomina valor de p.

A distribuição F de Snedecor, também chamada de distribuição de Fisher, é amplamente aplicada na inferência estatística para análise de variância. O teste F é utilizado para comparar variâncias que é a base para a ANOVA que, por sua vez, é uma técnica utilizada para comparar se as médias de três ou mais grupos são diferentes. A ideia do teste F é usar o resultado do F_{obs} para determinar se a hipótese nula deve ser rejeitada ou não com base na distribuição F, com graus de

liberdade e intervalo de confiança correspondente. F_{obs} , por sua vez, é a razão da variância explicada, ou aquela devido a outros fatores que não diretamente relacionadas à intervenção.

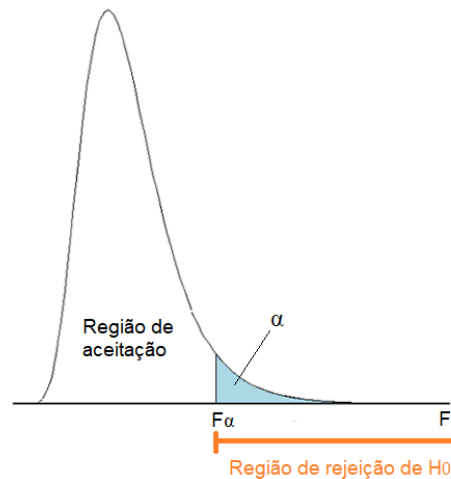
Na ANOVA, o teste de hipóteses emprega a distribuição F para avaliar a igualdade entre as médias através do cálculo do valor de F_{obs} conforme a Equação (14), o qual é utilizado para comparar variâncias.

$$F_{obs} = \frac{s_T^2}{s_R^2} \quad (14)$$

em que s_T^2 é um estimador ponderado da variância entre os tratamentos e s_R^2 é um estimador ponderado da variância dentro de cada tratamento. O teste F sempre é unicaudal à direita, pois a razão F_{obs} não pode ser negativa, como mostra a Figura 7.

Então o valor de F_{obs} é comparado com o da coordenada crítica do teste $F_{\alpha, GL1, GL2}$, em que α é o nível de significância escolhido para o teste e GL é o número de graus de liberdade associado ao numerador (1) e ao denominador (2). A região de rejeição do teste é determinada por $F_{\alpha, GL1, GL2}$ e assim aceita-se ou rejeita-se a hipótese nula, como ilustrado na Figura 7

Figura 7 — Região crítica do teste F.



Fonte: Do autor (2021).

O modelo estatístico usado na ANOVA bidirecional é expresso pela Equação (15).

$$y_{ij} = \eta + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (15)$$

em que y_{ij} é uma variável aleatória denotando a (ij)ésima observação, η é uma média global, τ_i é o efeito do i -ésimo tratamento, β_j é o efeito do j -ésimo bloco e ε_{ij} é o termo de erro aleatório, que é assumido como normal e independentemente distribuído.

O uso da ANOVA de dois fatores permite a comparação das médias observadas entre blocos aleatorizados. Neste caso, o procedimento ANOVA para um bloco completo aleatório usa uma identidade de soma de quadrados que divide a soma total de quadrados em três componentes: soma dos quadrados do tratamento (S_T), soma dos quadrados do bloco (S_B) e soma dos quadrados do erro (S_R) (MONTGOMERY, RUNGER e HUBELE, 2009). Assim além dos estimadores já apresentados para a ANOVA de fator único, o valor de F_{obs} para avaliar o efeito do bloco pode ser calculado a partir da Equação 16.

$$F_{obs} = \frac{S_B^2}{S_R^2} \quad (16)$$

em que S_B^2 representa a variabilidade entre os blocos.

O quadro ANOVA de dois fatores é apresentado pelo Quadro 2.

Quadro 2 – Quadro da ANOVA two way.

	SQ	GL	QM
Média	$S_A = Nk\bar{y}$	$v_A = 1$	$S_A^2 = \frac{S_A}{v_A}$
Blocos	$S_B = k \sum_{j=1}^k (\bar{y}_j - \bar{y})^2$	$v_B = n - 1$	$S_B^2 = \frac{S_B}{v_B}$
Entre tratamentos	$S_T = \sum_{i=1}^k n_t (\bar{y}_i - \bar{y})^2$	$v_T = k - 1$	$S_T^2 = \frac{S_T}{v_T}$
Dentro do tratamento	$S_R = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_t} (y_{ij} - \bar{y}_i - \bar{y}_j + \bar{y})^2$	$v_R = (n - 1)(k - 1)$	$S_R^2 = \frac{S_R}{v_R}$
Total	$S = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_t} y_{ij}^2$	N	

em que S_A é soma de quadrados total dos desvios da média, S_A^2 é a variância amostral, S_T é a soma dos quadrados dos desvios da média do j -ésimo tratamento, v_T é o número de graus de liberdade

associado aos tratamentos, e s_T^2 é a variância amostral associada ao tratamento, S_R é a soma de quadrados dos resíduos, s_R^2 é um estimador ponderado da variância populacional comum σ^2 , \bar{y} é a média geral para todos tratamentos e S é a soma de quadrados total.

A ANOVA bidirecional também possibilita tratar os planejamentos fatoriais com duas classificações. Nesse caso, dispendo-se de réplicas da observação é possível inserir um novo termo no modelo estatístico, w_{ij} , o qual representa o efeito da interação entre o tratamento e o bloco, como mostra a Equação 17.

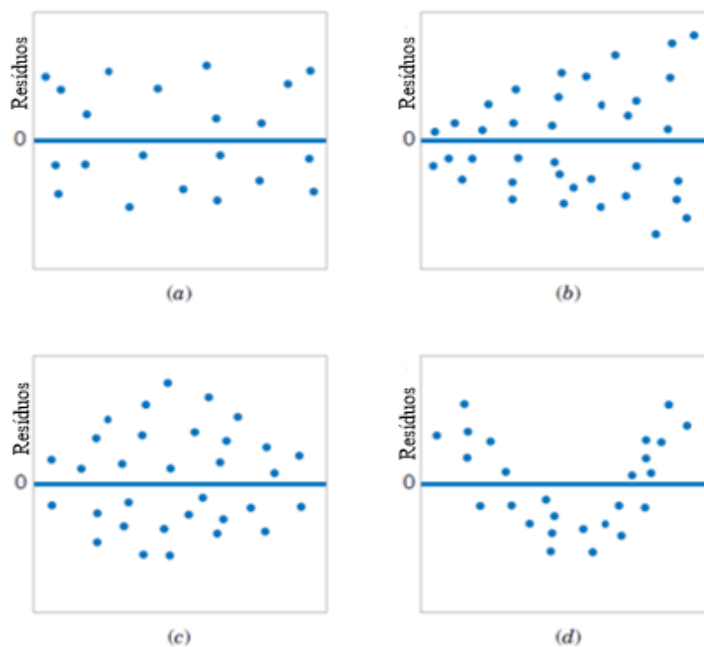
$$y_{ij} = \eta + \tau_i + \beta_j + w_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (17)$$

Para garantir a suposição em relação ao erro, destaca-se a importância da execução do experimento completamente aleatório, preferencialmente em ordem aleatória e sob condições o mais uniforme possível para aplicação dos tratamentos (MONTGOMERY, RUNGER e HUBELE, 2009). Ao final da análise dos resultados é importante executar uma análise residual e verificação de modelo.

Para isso o comportamento dos resíduos pode ser avaliado através de gráficos. Um resíduo é a diferença entre uma observação Y e seu valor estimado (ou ajustado) do modelo estatístico que está sendo estudado. Primeiro a suposição de normalidade pode ser verificada construindo um gráfico de probabilidade normal dos resíduos, que apresenta de forma simples se os resíduos seguem uma distribuição normal.

Além disso, pode-se verificar a suposição de variâncias iguais em cada nível do fator, plotando os resíduos em relação aos níveis e comparando a dispersão dos valores. Os resíduos devem ser independentes do valor observado, logo devem ser distribuídos aleatoriamente em torno de 0 conforme mostrado na Figura 8(a). Já as Figuras 8(b), 8(c) e 8(d) representam comportamentos que geralmente são identificados quando não há distribuição aleatória dos erros em torno de 0.

Figura 8 — Padrões de comportamento do gráfico de resíduos.



Fonte: Adaptado de Montgomery, Runger e Hubele (2009).

Por fim, o gráfico de resíduos versus preditos pode indicar heteroscedasticidade, isto é, quando encontram-se tendências e é chamado de homocedástico quando os pontos estão distribuídos aleatoriamente, sem nenhum comportamento ou tendências.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados conforme as Instruções de Trabalho do Laboratório da Extrativa Fertilizantes, sendo essas instruções confeccionadas com base nos métodos oficiais do MAPA, Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2017).

3.1 Reagentes e Materiais

Para o preparo das soluções e análises foram utilizados os seguintes reagentes e materiais:

Acetato de amônio P.A (Dinâmica Química Contemporânea), acetato de potássio P.A (Neon), ácido acético glacial 100% P.A (Química Moderna), ácido bórico PA (Dinâmica Química Contemporânea), ácido clorídrico 37% P.A (Micro Química), ácido L-áscorbico P.A (Dinâmica Química Contemporânea), agitador magnético, água deionizada, azometina-H P.A (Anidrol), balança analítica, balões volumétricos de 25, 100, 200, 500 e 1000 mL, béqueres de 250, 1000 mL, béquer de polipropileno de 1000 mL, chapa aquecedora, dessecador, espectrofotômetro de absorção molecular (Hach, modelo DR/2500), Espectrômetro de Absorção atômica (Perkin Elmer, modelo PinAAcle 900F), estufa, fitas de pH, funil, moinho pulverizador de panela, papel de filtro quantitativo, padrão primário de boro 1000 mg/L (Specsol), pembroim (imã), peneira de 0,5 mm, pipeta volumétrica de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25 e 30 mL, provetas de 50 e 100 mL, quarteador de Jones, titriplex III P.A (Merck) e vidro de relógio.

3.2 Preparo de Soluções

Para realização de análises de soluções de amostra de microfertilizantes e ácido bórico pelo método de azometina-H realizou-se a preparação das soluções descritas a seguir.

3.2.1 Solução de Azometina – H

Para o preparo dessa solução, inicialmente, pesou-se 1,0 g de azometina-H com o auxílio de um vidro de relógio e transferiu-se para um béquer de 1000 mL. Pesou-se 2,0 g de ácido L-áscorbico e transferiu-se para o béquer. Posteriormente adicionou-se 100 mL de água deionizada e colocou a solução no agitador magnético até que todos os cristais de dissolvessem.

3.2.2 *Solução Padrão de Boro a 200 mg/L*

Uma determinada massa de ácido bórico, H_3BO_3 , foi seca em estufa a $80\text{ }^\circ\text{C}$ por uma hora. Decorrido o tempo, o material foi retirado da estufa e colocado para esfriar no dessecador. Posteriormente, 1,1464 g de H_3BO_3 foi medida e dissolvida em um béquer juntamente com 500 mL de água deionizada a fim de obter uma solução com concentração de 200 mg/L de Boro. A mistura foi transferida quantitativamente para o balão de 1000 mL, o qual foi completado com água deionizada. Em seguida, a solução foi agitada até que todos os cristais se dissolvessem. Após completar o balão, procedeu-se a homogeneização da solução, que foi então transferida para frasco devidamente identificado. Essa solução pode ser utilizada por um período de até um ano após o preparo. Esse preparo foi realizado em duplicata e as soluções receberam o nome de Padrão A 200 mg/L e Padrão B 200 mg/L.

3.2.3 *Solução Padrão de Boro a 3 mg/L*

Das soluções padrão A e padrão B de 200 mg/L foram pipetados 15 mL e transferidos para os balões volumétricos de 1000 mL. Avolumou-se os balões com água deionizada e homogeneizou-se as soluções. As soluções foram transferidas para frascos devidamente identificados podendo ser utilizadas por um período de até 30 dias após o preparo. Essas soluções receberam o nome de Padrão A 3 mg/L e Padrão B 3 mg/L.

3.2.4 *Solução Tampão Complexante*

O preparo da solução tampão consistiu em pesar, em balança analítica com precisão de 0,0001 g, 140 g de acetato de amônio, 10 g de acetato de potássio e 14 g de titriplex III em vidro de relógio e realizou-se transferências quantitativas para um béquer de 1000 mL.

Posteriormente, cerca de 35 mL de ácido acético a 100 % e 500 mL de água deionizada foram adicionados ao béquer. Então, o béquer foi tampado com vidro de relógio e colocado no agitador magnético até que houvesse solubilização de todos os cristais. Com o auxílio de um funil, a solução foi transferida quantitativamente para um balão de 1000 mL e, em seguida, o balão foi avolumado com água deionizada e a solução foi homogeneizada. A solução foi transferida para frasco devidamente identificado podendo ser utilizada por um período de até um ano após o preparo.

A solução de azometina-H possui pH abaixo de 4. Com isso haveria uma interferência na determinação de boro, pois a reação para formação de azometina-H sofre grande influência do pH. Por isso adiciona-se a solução tampão para que o pH fique em torno de 5,4.

3.2.5 Preparo de soluções para construção da Curva Analítica de Boro

Uma solução de 5,0 ppm de Boro foi preparada a partir de uma das soluções padrão de 200 mg/L de boro para construção da curva analítica do método proposto. Dessa solução, foram pipetados 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL e transferidos para balões volumétricos de 25 mL de capacidade. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de água deionizada e, em seguida, 5mL da solução tampão complexante. As soluções foram homogeneizadas e aguardou-se 5 minutos. Decorrido o tempo, foram acrescentados 2 mL da solução de azometina-H, seguido de agitação dos balões volumétricos e repouso por mais 5 minutos. Após esse intervalo, os balões foram completados e homogeneizados. Aguardou-se 60 minutos para realização das análises no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm. A Figura 9 apresenta as soluções preparadas. Essas soluções contêm, respectivamente, 0(branco); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,00 mg/L de Boro.

Figura 9 — Soluções utilizadas para construção da curva analítica de boro.



Fonte: Do autor (2021).

3.3 Preparo das Amostras de Fertilizantes para Análise Química

Por se tratar de amostra sólida, o preparo das amostras de fertilizantes foi necessário como procedimento prévio às análises por espectrofotometria UV-Vis. Para isso, todas as amostras foram homogeneizadas em um quarteador de Jones por três vezes e posteriormente as suas massas foram

reduzidas, por meio do mesmo aparato, até 300 g, aproximadamente. Após a homogeneização e redução de massa de cada amostra 100 g foram separadas para pulverização. A pulverização foi realizada em um moinho pulverizador de panela por 20 s. Posteriormente, as amostras foram peneiradas em uma peneira de 0,50 mm e o material retido na peneira foi novamente moído até que toda a amostra fosse passante pela peneira. A amostra foi colocada em um saco plástico, devidamente identificado e submetido à agitação para homogeneização da amostra.

Após o processo de pulverização e homogeneização, pesou-se quantidade necessária de material, conforme indicado na Tabela 4, em vidro de relógio utilizando-se uma balança analítica $\pm 0,0001$ g. O material pesado foi transferido quantitativamente para um béquer de 250 mL, onde adicionou-se aproximadamente 15 mL de água deionizada e 30 mL de HCl 37% P.A a fim de realizar a digestão da amostra. Em seguida, o béquer foi tampado com vidro de relógio e colocado em chapa aquecedora à 250 °C por 30 min. Esse processo ocorreu dentro de uma capela de exaustão. Decorrido o tempo, retirou-se o béquer da chapa aquecedora e aguardou-se esfriar. Posteriormente, o material do béquer foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico que foi avolumado com água deionizada e homogeneizado. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo. Após a filtração, foi observado a presença de sólidos no filtro, porém a facilidade de digestão do boro na presença de HCl indica que esse material restante não apresentava o analito, ou seja, os materiais sólidos presentes no filtro não eram provenientes do analito.

A massa da amostra e a diluição necessária para realização da análise espectrofotométrica foram calculadas conforme a instrução de trabalho para análise de Boro, pelo método Azometina-H, da Empresa Extrativa Fertilizantes. A Tabela 4 apresenta os valores de massa de amostra medida, a capacidade do balão volumétrico avolumado após o preparo da amostra, os volumes dessa solução pipetados e a capacidade do balão volumétrico empregado no processo de diluição da solução da amostra, de acordo com o teor teórico de Boro em microfertilizantes.

Quadro 3 — Massa de amostra e diluição do extrato para análise de boro em balão volumétrico de 100 mL.

Teor de Boro (%)	Massa (g)	Balão volumétrico (mL)	1ª alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)	2ª alíquota (mL)
Baixo teor 0,01 a 0,20	$\frac{0,06}{Teor}$	500,0	25,0	-	-
Médio teor 0,20 a 2,0	$\frac{0,6}{Teor}$	1000,0	5,0	-	-
Alto teor >2	$\frac{6}{Teor}$	1000,0	10,0	500	25

Fonte: Instrução de Trabalho Extrativa Fertilizantes.

Em um balão de 100 mL foram adicionados uma alíquota (conforme Tabela 4), 30 mL da solução tampão complexante, 10 mL de HCl a 3% e 10 mL da solução de Azometina-H. Em seguida completou-se o balão e realizou-se a homogeneização. Verificou-se o pH da solução por meio de fitas de pH. Esta solução foi guardada ao abrigo de luz por 60 minutos antes da análise.

A reação de condensação da azometina-H na presença de ácido bórico apresenta cinética lenta, sendo assim, as soluções de trabalho necessitam de um intervalo de tempo suficiente para que a reação ocorra de forma eficiente.

3.4 Preparação das Soluções para Análise Espectrofotométrica

Realizou-se a preparação de soluções padrão em duplicata, essas receberam o nome de Padrão A e Padrão B. Essas soluções foram analisadas no espectrofotômetro e o resultado das absorbâncias foram utilizadas no cálculo do fato. Para o preparo dessas soluções, inicialmente, transferiu-se 10 mL da solução padrão A de Boro 3 mg/L para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se: 30 mL de solução tampão complexante, 10 mL de solução HCl a 3% e 10 mL de solução de Azometina-H. Em seguida, o balão foi completado com água deionizada e realizou-se a homogeneização. Verificou-se o pH da solução por meio de fitas de pH. Esta solução foi guardada ao abrigo de luz por 60 minutos antes da análise. A partir da solução padrão B 3 mg/L, o mesmo procedimento foi empregado.

As soluções padrão A e padrão B, constituem uma replicata, e apresentam como intuito certificar a calibração do equipamento para realização da análise espectrofotométrica. A partir desses procedimentos torna-se possível a realização de análises na rotina do laboratório sem a necessidade de construir novas curvas de calibração diariamente.

A solução do branco de reagente também foi preparada da seguinte maneira: Em um balão volumétrico de 100 mL, foram adicionados 30 mL de solução tampão complexante, 10 mL de solução HCl a 3% e 10 mL de solução de Azometina – H. Em seguida, o balão foi completado com água deionizada e realizou-se a homogeneização. Verificou-se o pH da solução por meio de fitas de pH.

Esta solução foi guardada ao abrigo de luz por 60 minutos antes da análise. A Figura 10 apresenta as soluções testes para análise espectrofotométrica.

Figura 10 — Soluções utilizadas para análise espectrofotométrica.



Fonte: Do autor (2021).

3.5 Análise Espectrofotométrica

As análises no espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção do complexo de Boro. Para isso, o equipamento foi ligado e o comprimento de onda, 410 nm, selecionado. Após 60 minutos de estabilização do sistema, a cubeta contendo o branco foi introduzida no espectrômetro e teclou-se em “zero”. Posteriormente, o padrão A foi analisado seguido pela análise do padrão B. Após a leitura dos padrões, precedeu-se as análises das amostras.

Todas as análises foram realizadas após a cubeta ser devidamente ambientada pela solução a ser analisada.

As análises foram realizadas com ácido bórico e microfertilizantes em um intervalo de 1 a 15% de teor de boro. Foram preparadas triplicatas de solução de amostra em cada nível de concentração e cada solução foi analisada em duplicata.

3.6 Constante de Correlação K

Para o cálculo da constante de correlação K utilizou-se a Equação 18.

$$K = \frac{APA}{APB} \quad (18)$$

em que: APA é a análise do padrão A e APB é a análise do padrão B.

A constante de correlação deve estar entre 0,9710 à 1,0310 e a leitura dos padrões devem estar entre 0,280 à 0,320. Se a constante K e a leitura dos padrões estiverem fora dessas faixas, as seguintes providências devem ser tomadas:

- 1- Verificar o caminho óptico realizando a limpeza da cubeta;
- 2- Preparar novos padrões (padrão A e padrão B a 3 mg/L);
- 3- Preparar novos padrões (padrão A e padrão B a 200 mg/L).

3.7 Determinação do Teor de Boro.

O cálculo do teor de Boro foi realizado conforme a instrução de trabalho para análise de boro pelo método azometina-H da empresa Extrativa Fertilizantes. A Equação (19) apresenta o cálculo para determinação do teor de boro a partir das análises no espectrofotômetro.

$$\%B = \frac{AA.X}{MA} \cdot \frac{0,3.K}{APA} \quad (19)$$

em que AA é a absorvância da amostra, K é a constante de correlação determinada pela Equação (18), APA é absorvância do padrão A, MA é a massa da amostra, 0,3 é a constante teórica padrão e X é uma constante que varia conforme o teor, sendo 0,2; 2 e 20 para baixo, médio e alto teor, respectivamente.

3.8 Análises por absorção atômica de chama (FAAS)

A fim de comparar os resultados obtidos pelo método proposto com um método quantitativo de análise de boro em fertilizantes, a espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS) foi empregada. Essa metodologia foi escolhida devido a disponibilidade do equipamento na empresa e por já serem realizadas análises de boro por este método.

Utilizando-se ácido bórico P.A, foram feitas análises em triplicatas sendo realizadas duas análises em cada replicata. Escolheu-se os teores de 1, 5, 10 e 15%, pois na faixa de 1 a 15% encontram-se os teores de boro dos microfertilizantes produzidos pela empresa. Para a análise na FAAS realizou-se as diluições das amostras conforme a Equação 20.

$$PPM = \frac{MA \cdot T \cdot 10000}{BV} \quad (20)$$

em que MA é a massa da amostra, T é o teor esperado, BV é o balão volumétrico utilizado na diluição e PPM é o valor em partes por milhão do analito após a diluição. Esse cálculo se faz necessário devido a faixa de concentração da curva analítica, sendo assim é possível determinar a massa a ser medida e o balão volumétrico utilizado.

Após medição da massa em balança analítica, realizou-se o processo de digestão da amostra com água deionizada e HCl 37% P.A como descrito na *seção 3.3*. Nesse caso não houve necessidade da realização de amostragem e pulverização pois o ácido bórico PA utilizado estava em pó e apresentava alta pureza. Para execução das análises, foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 250, 500 e 750 ppm, utilizando-se o padrão primário de boro de 1000mg/L próprio para análises em equipamentos de absorção atômica. Após o preparo das soluções estabeleceu-se as análises na FAAS.

3.9 Tratamento estatístico dos resultados

As análises das soluções de ácido bórico pelo método da azometina-H e pela espectrometria de absorção de chama foram realizadas em 4 níveis de concentração, de modo que a preparação das soluções foi feita em triplicata e, cada uma foi analisada em duplicata. Para o tratamento estatístico de dados foram calculadas as médias dos resultados obtidos em cada nível de concentração e seu respectivo desvio padrão. A partir da média e desvio padrão foi calculado o desvio padrão relativo pela Equação 8, adotando-se o valor de 5% como critério de aceitabilidade.

A fim de comparar os resultados obtidos pelos dois métodos estudados realizou-se o teste t, com nível de confiança de 95%, após ter feito o teste F para comparar a variâncias das amostras.

Na implementação do método oficial, aplicou-se a ANOVA bidirecional para planejamentos fatoriais com duas classificações, utilizando o modelo estatístico da Equação 17. Nessa análise adotou-se um nível de confiança de 95% e nível de significância de 5%.

3.10 Validação do Método

3.10.1 Procedimento para Determinação dos Limites de Quantificação (LQ) e Limites de Detecção (LD)

A fim de se obter os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram realizadas 10 replicatas utilizando uma amostra de fertilizante com o menor teor de boro disponível. Inicialmente, empregou-se os procedimentos conforme a *seção 3.3*. Após a digestão das amostras, realizou-se transferência quantitativa para o balão volumétrico. Em seguida, completou-se o volume do balão e procedeu-se a homogeneização. Posteriormente, realizou-se a diluição da solução da amostra para análise espectrofotométrica conforme o *item 3.3.2*. Para submeter a análise no equipamento, preparou-se soluções de branco reagente conforme *item 3.5.3*.

As soluções da amostra foram analisadas seguindo o procedimento descrito no item 3.5.

O limite de quantificação e o limite de detecção foram calculados a partir das Equações 4, 5, 6 e 7.

3.10.2 Procedimento para Análise do Efeito de matriz

Para o estudo de efeito de matriz, inicialmente construiu-se uma curva analítica em puro solvente conforme procedimento descrito no item 3.2.5, sendo as soluções preparadas em triplicata e analisadas em duplicata.

Posteriormente, construiu-se uma curva analítica matrizada seguindo-se o seguinte procedimento:

Uma solução de 5,0 ppm de Boro foi empregada para construção da curva analítica do método proposto. Dessa solução, foram pipetados 0,0 – 1,0 – 2,0 – 3,0 – 4,0 e 5,0 mL e transferidos para balões volumétricos de 25 mL de capacidade. Posteriormente, adicionou-se 2,5 mL de HCl a 3%, 7,5 mL da solução tampão complexante e 2,5 mL da solução de azometina-H e 6 mL da solução de amostra de baixo teor, que é o branco de amostra. Os balões tiveram seus volumes completados com água deionizada e foram homogeneizados. Aguardou-se 60 minutos para realização das

análises no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm. Esses procedimentos foram realizados em triplicata e cada solução foi analisada em duas vezes.

Para análise do efeito de matriz foram plotadas as curvas analíticas em puro solvente e em solução da amostra (curva matrizada) considerando todos os dados obtidos. Avaliou-se o valor do coeficiente de determinação R^2 , a existência de paralelismo entre as curvas por meio do teste F e teste t de hipóteses para avaliar se houve efeito de matriz. Para esses testes adotou-se um nível de confiança de 95% com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

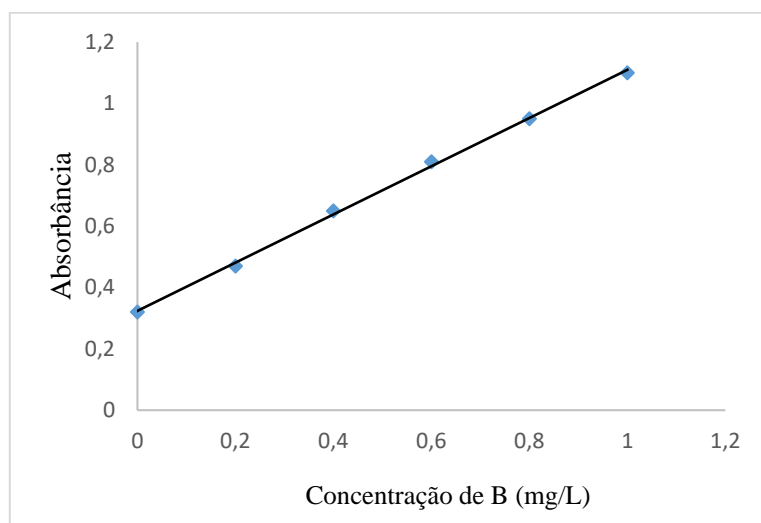
4.1 Implementação do Método Oficial do MAPA (2017)

A fim de investigar o uso do método espectrofotométrico empregando a azometina-H para quantificar o teor de boro em microfertilizantes, inicialmente uma curva analítica foi construída para a quantificação no espectrofotômetro UV/Visível. A equação da reta obtida é apresentada pela Equação 21.

$$y = 0,7857x + 0,3238 \quad (21)$$

A partir da Figura 11 observa-se que a resposta linear foi obtida na faixa de 0 a 1 mg/L, com coeficiente de determinação, R^2 , igual a 0,9986.

Figura 11 — Curva analítica de Boro.



Fonte: Do autor (2021).

Foram analisadas soluções de ácido bórico (H_3BO_3) em diferentes níveis de concentração de boro. Foram calculadas as médias e desvios padrão para cada nível de concentração, posteriormente calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) pela Equação 8 e o erro absoluto, a fim de comparar os erros em torno da média e em torno do valor exato, respectivamente. Os resultados obtidos pelo método da azometina-H no espectrofotômetro são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 — Teor de Boro e desvio padrão relativo obtidos das análises de solução de ácido bórico pelo método da azometina-H.

Concentração de boro (%)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	DPR (%)	Erro absoluto
15	15,09	15,13	15,28	0,97	0,13
	14,89	15,08	15,29		
10	10,13	10,00	10,37	2,08	0,14
	10,16	9,81	10,34		
5	5,17	5,27	5,28	1,31	0,24
	5,33	5,23	5,15		
1	1,00	1,121	0,96	8,01	0,04
	1,00	1,157	0,97		

Fonte: Do autor (2021).

Pode ser verificado na Tabela 1 que os valores encontrados experimentalmente foram próximos dos teores esperados em cada solução, com desvio padrão relativo menor que 5% para todos os casos, exceto o da solução com concentração de 1 %m/m, cujo desvio padrão relativo foi de 8,01% do valor da média, inferindo erros no preparo de solução ou ambientação ineficiente da cubeta. Além disso, como já esperado, foi identificado que o desvio padrão relativo menor foi encontrado no maior nível de concentração, com um valor de 0,97%. No cálculo do erro absoluto observa-se que os valores encontrados para o menor nível de concentração se apresentaram mais próximos do valor exato.

4.2 Comparação de Métodos

A fim de comparar os resultados obtidos pelo método da azometina-H, realizou-se análises utilizando a espectrometria de absorção atômica de chama, também empregando soluções de ácido bórico PA. Os valores encontrados são apresentados pela Tabela 2. O segundo experimento apresentou um valor muito distinto para concentração de 15%. Esse erro pode ser justificado devido

à problemas no preparo da solução padrão, pois como o Boro é um elemento muito leve e o equipamento apresenta dificuldades para análise desse semimetal, essa análise pode ser facilmente abalada por pequenas interferências ou erros de preparo. Dessa maneira, optou-se por remover esse dado para que a medida seja melhor representada.

Tabela 2 — Teor de Boro e desvio padrão relativo obtidos das análises de soluções de ácido bórico por espectrometria de absorção atômica de chama.

Concentração de boro (%)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	DPR (%)	Erro absoluto
15	15,04	16,78	15,93	2,43*	0,41*
	15,36	18,12	15,30		
10	10,02	9,09	9,69	7,53	0,22
	9,587	11,12	9,20		
5	5,11	5,05	5,48	8,91	0,25
	4,79	6,09	5,004		
1	1,09	0,98	1,01	8,00	0,02
	0,93	1,14	0,96		

*desconsiderando experimento 2

Fonte: Do autor (2021).

Calculou-se o erro absoluto e o desvio padrão relativo a partir das médias e desvio padrão para cada concentração. Considerando-se todos os dados na concentração de 15%, o DPR obtido foi de 7,29 % e o erro absoluto foi de 1,09. Dessa maneira, a partir do erro absoluto obtido nota-se que houve uma grande diferença em relação ao valor exato. Nota-se também que, novamente, o menor erro absoluto foi para o menor nível de concentração. Além disso, verifica-se que o desvio padrão relativo em todos os níveis de concentração foi inferior a 8,91 %. Com exceção do menor nível de concentração, esses DPR foram maiores do que aqueles obtidos pelo método espectrofotométrico, o que indica menor predição das análises realizadas pela espectrometria de absorção atômica de chama. Na espectrometria de absorção atômica de chama apenas uma

quantidade do elemento boro é atomizada, isso ocorre porque são formados óxidos e carbetos de boro altamente estáveis. Dessa maneira, quanto menor a quantidade de boro presente na solução de amostra menor é a capacidade do equipamento em quantificar o analito, o que justifica maior variação nos resultados.

Para comparar os resultados obtidos pela FAAS com o método da azometina-H realizou-se um teste F para comparação de duas variâncias, no qual o valor de F_{obs} foi de 1,135 e o $F_{crítico}$ foi de 2,014 indicando que as variâncias podem ser consideradas iguais ($F_{obs} < F_{crítico}$). A partir disso, aplicou-se um teste t para duas amostras presumindo variâncias iguais com nível de significância de 5%, o valor de p foi igual à 1,679 constatando-se que não há diferenças significativas entre as médias dos dois grupos ($p > 0,05$), ou seja, apesar da menor assertividade dos resultados obtidos por FAAS, ambos os métodos apresentaram resultados próximos.

4.3 Análise de Microfertilizantes pelo Método da Azometina-H

Após empregar o método espectrofotométrico com azometina-H para análises das soluções de ácido bórico, o mesmo método foi aplicado para quantificar o teor de boro em amostras de microfertilizantes produzidos pela Extrativa Fertilizantes. Os resultados obtidos das análises de nove amostras com diferentes teores estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 — Teor de Boro e desvio padrão relativo das análises de 9 amostras de microfertilizantes pelo método da azometina-H (continua).

Concentração de boro (%)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	DPR (%)	Erro absoluto
15	15,06	14,78	14,84	1,09	0,07
	15,01	15,13	14,74		
14	14,08	14,22	14,40	1,02	0,22
	14,04	14,22	14,36		
10	10,40	10,06	10,30	1,93	0,17
	10,26	9,86	10,11		
8	8,12	8,08	8,07	0,76	0,13
	8,15	8,24	8,10		
6	6,01	6,00	6,06	1,52	0,04
	6,21	6,02	5,94		

Tabela 3 — Teor de Boro e desvio padrão relativo das análises de 9 amostras de microfertilizantes pelo método da azometina-H (conclusão).

Concentração de boro (%)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	DPR (%)	Erro absoluto
5	5,37	5,08	5,07	2,74	0,18
	5,35	5,14	5,07		
4	3,91	3,83	3,94	2,10	0,11
	3,94	3,76	3,97		
2	1,97	1,93	0,98	3,71	0,01
	2,10	1,94	0,97		
1	1,04	0,98	1,02	3,48	0,01
	1,06	0,97	1,02		

Fonte: Do autor (2021).

Os DPR (Tabela 3) da triplicata de cada amostra foram inferiores a 3,71%. Por esses resultados, pode-se inferir que o método apresenta alta predição quando aplicado em amostras reais de fertilizantes. Além disso, nota-se que o erro absoluto foi menor para os menores níveis de concentração. O mesmo ocorreu para as análises pelo método da absorção atômica de chama, no entanto o maior valor do erro absoluto nesse caso foi de 0,22 enquanto que para a FAAS foi de 0,25 (Tabela 2). Dessa maneira observa-se que o método da azometina-H apresentou melhor desempenho quando comparado com a espectrometria de absorção de chama.

Empregou-se uma análise de variância a fim de avaliar se as medidas diferiram apenas devido aos níveis de concentração das soluções ou se as réplicas apresentaram respostas estatisticamente diferentes. Na Tabela 4 são apresentados os valores de SQ, GL e QM do quadro de ANOVA (Quadro 2), porém como essa análise foi empregada para planejamentos fatoriais com duas classificações, os valores obtidos do cálculo de interação são adicionados ao quadro de ANOVA. Na coluna F são apresentados os valores de F_{obs} da distribuição F e, na última coluna estão os valores de p que são comparados com o nível de significância de 0,05. Na primeira linha são apresentados os valores obtidos em relação à média, os resultados da segunda linha estão relacionados ao efeito do tratamento (teor conhecido da amostra), a terceira linha mostra os resultados para o efeito dos blocos (experimento), a quarta linha mostra o efeito de interação entre os fatores e na última linha estão os valores obtidos em relação ao componente de erro.

Tabela 4 — Quadro da ANOVA com dois fatores para avaliação dos resultados das análises de fertilizantes pelo método da azometina-H.

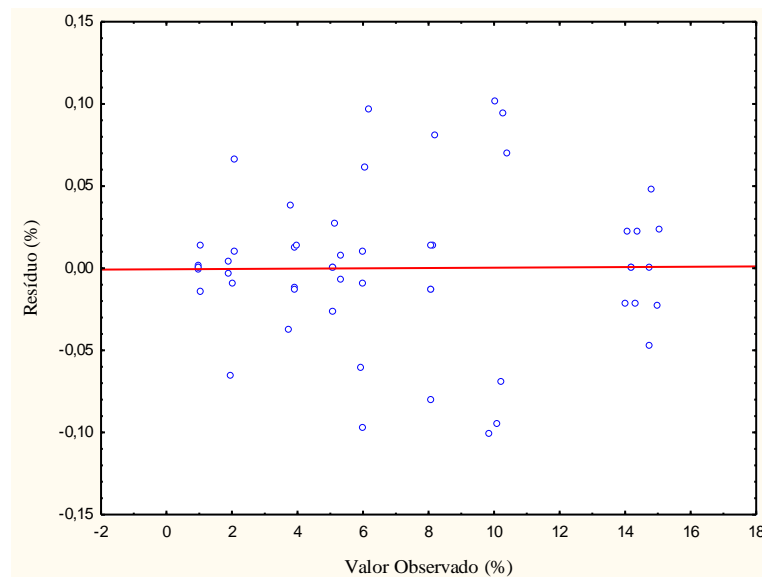
	SQ	GL	QM	F	Valor-p
Média	2759,20	1	2759,20	652239,1	0,0000
Teor conhecido da amostra	1106,53	8	138,32	32696,1	0,0000
Experimento	0,13	2	0,06	15,0	0,0000
Interação entre os fatores	0,37	16	0,02	5,5	0,0001
Resíduo	0,11	26	0,00		

Fonte: Do autor (2021).

Conforme os resultados da análise de variância apresentados na Tabela 4, ao nível de significância de 5%, verificou-se que, como esperado, o valor determinado pelo método difere entre uma medida e outra conforme o teor de analito conhecido da amostra ($\text{Valor-p} < 0,05$). No entanto, constatou-se também que o resultado obtido foi diferente entre os experimentos realizados. Este resultado confirma a possibilidade de interferências causadas por substâncias que compõem os microfertilizantes empregados nas análises, conforme mencionado anteriormente.

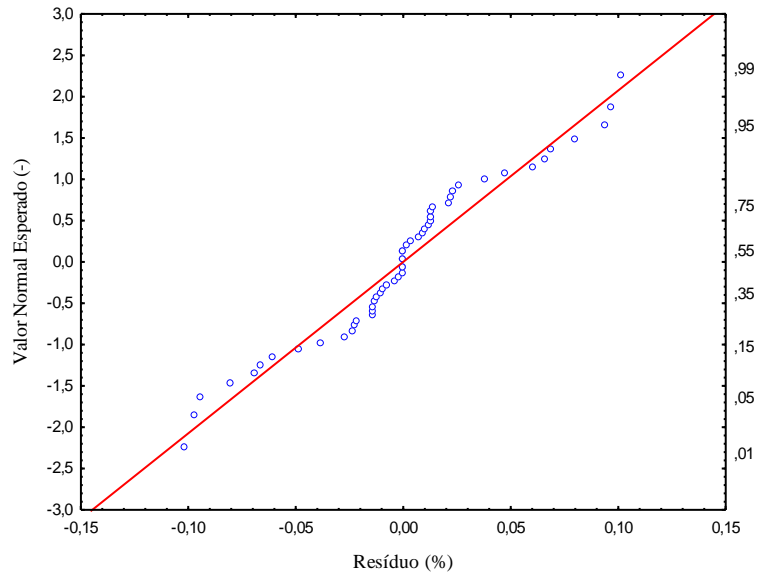
Utilizando-se o software Statistica plotou-se os gráficos de distribuição de resíduos e o gráfico de probabilidade normal, a fim de analisar o comportamento dos resultados experimentais. As Figuras 12 e 13 apresentam esses gráficos, respectivamente.

Figura 12 — Resíduos versus valor observado para as análises de boro em microfertilizantes pelo método de azometina-H



Fonte: Do autor (2021).

Figura 13 — Gráfico de probabilidade normal para as análises de boro em microfertilizantes pelo método de azometina-H.



Fonte: Do autor (2021).

É esperado que os resíduos estejam aleatoriamente distribuídos em torno de zero. Realizando a análise de variância, considerando todos os resultados da Tabela 8, foi possível verificar a presença de um *outlier* no ponto de 15,13, o que dificultava a visualização do comportamento do gráfico de resíduos. Dessa maneira, optou-se por remover este ponto proveniente da segunda análise do experimento 2 na concentração de 15%. Na Figura 12 nota-se que não há uma tendência de aumento ou diminuição da variância com a mudança do valor observado. Sendo assim, os resíduos apresentaram comportamento semelhante ao que foi apresentado na Figura 8a, indicando que os mesmos seguem uma distribuição aleatória. Na Figura 13, pode ser observado que os pontos se apresentam bem próximos da reta de probabilidade normal, evidenciando que os erros seguem uma distribuição normal conforme o esperado.

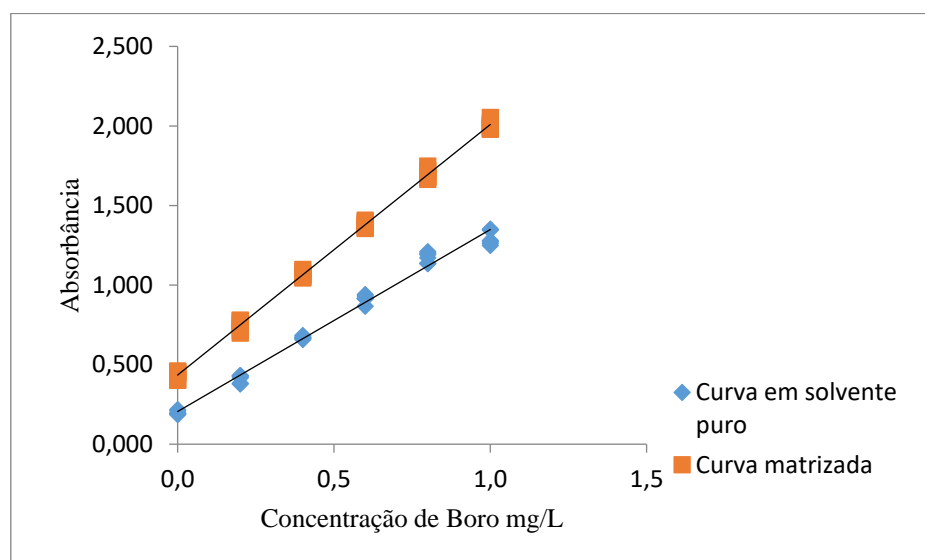
Diante da diferença de resultados entre os experimentos, confirmadas pela análise de variância, constata-se que há interferências contidas nas amostras de microfertilizantes. Como mencionado anteriormente, os microfertilizantes produzidos pela empresa podem conter ferro e outros componentes. Dessa maneira, recomenda-se um estudo dessas interferências e a constatação se há efeito de matriz nas análises empregadas.

4.4 Validação de Método

4.4.1 Avaliação da Seletividade e Efeito de Matriz

A fim de obter a validação do método proposto, construíram-se duas curvas analíticas: a curva analítica em puro solvente e a curva analítica matrizada. A Figura 14 apresenta o gráfico comparativo entre as curvas.

Figura 14 — Curva analítica em puro solvente e curva analítica matrizada.



Fonte: Do autor (2021).

As equações da reta obtidas para a curva analítica em puro solvente e para curva analítica matrizada são apresentadas pelas Equações 22 e 23, respectivamente.

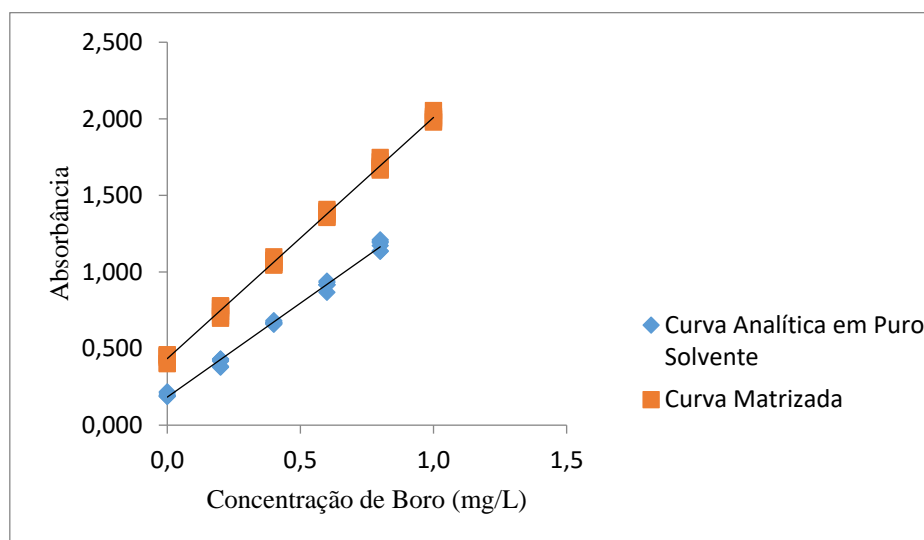
$$y = 1,1437x + 0,2053 \quad (22)$$

$$y = 1,5745x + 0,4345 \quad (23)$$

O coeficiente de determinação R^2 da curva analítica em puro solvente foi de 0,9883 enquanto que para a curva analítica matrizada esse resultado foi de 0,9979. Conforme estabelecido pelo critério de linearidade do método o valor de R^2 deve estar entre 0,99 e 1. Ao observar o ajuste fornecido pela regressão linear da curva em puro solvente, percebe-se que o último ponto (1 mg/L) acarreta em um leve decaimento da curva, indicando a existência de desvios da Lei de Beer. Diante disso, optou-se por remover esse ponto para avaliar a linearidade dessa curva analítica. A Figura

15 apresenta as curvas analíticas removendo as análises realizadas na concentração de 1 mg/L de boro para a curva analítica em puro solvente.

Figura 15 — Curva analítica matrizada e curva analítica em puro solvente sem o último nível de concentração



Fonte: Do autor (2021).

A equação da reta obtida para a curva analítica em puro solvente sem o último nível de concentração é apresentada pela Equação 24.

$$y = 1,2268x + 0,1831 \quad (24)$$

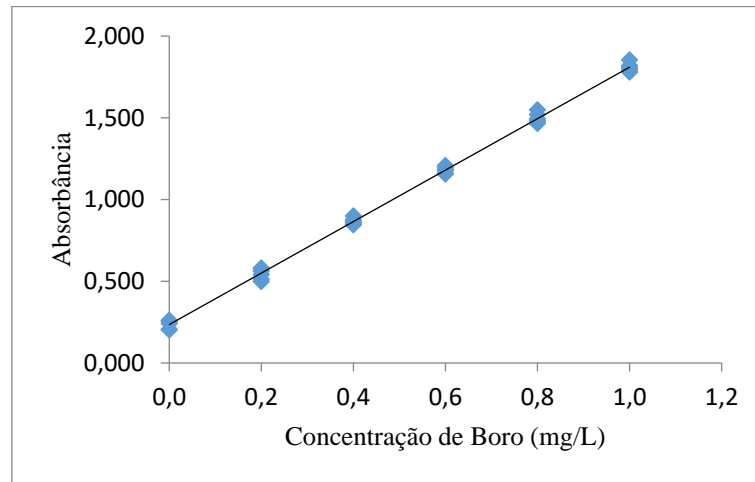
Após a remoção dos pontos no último nível de concentração o valor do coeficiente de determinação R^2 foi de 0,9954, mostrando que houve um aumento considerável ao realizar a remoção das análises na concentração de 1 mg/L, sendo assim, pode-se inferir que houve desvios reais da Lei de Beer, que ocorreu devido ao aumento da concentração. Outro ponto a ser notado é que, visualmente, não há paralelismo entre as curvas indicando a existência do efeito de matriz. Para verificar se houve efeito de matriz, a comparação das inclinações e interseções das duas curvas analíticas foi realizada. Para isso, uma análise de variância foi realizada, na qual fez-se um teste F em que o valor de F_{obs} foi de 2,921 e o de $F_{crítico}$ de 1,772, indicando heterocedasticidade, ou seja, as variâncias não podem ser consideradas iguais ($F_{obs} > F_{crítico}$). O teste t de hipóteses com variâncias distintas, com nível de significância de 0,05, foi sequencialmente aplicado comparando-se as

inclinações e interseções das retas (Equações 23 e 24), confirmando o não paralelismo entre as curvas e, conseqüentemente o efeito de matriz sobre a precisão do método. Desta forma, para garantir resultados confiáveis na determinação de boro de amostras de microfertilizantes comerciais, a quantificação do analito deverá ser realizado pela curva analítica matrizada. Por conter todos os constituintes da amostra, esta forma de quantificação corrigirá qualquer tipo de possível interferência, inclusive do ferro, se estiver presente no microfertilizante.

A identificação do efeito de matriz justifica, inclusive, o estudo da análise de variância para os experimentos realizados em microfertilizantes (Tabela 4), que mostrou que o resultado obtido entre os experimentos foi diferente, já que a quantificação foi realizada por curva analítica em puro solvente. Esta curva analítica não contém os constituintes da matriz (amostra), além de apresentar indicativo de desvio da lei de Beer no nível de concentração de 1 mg/L, nível que permitiria a análise de microfertilizantes com teores maiores que 15%. Ainda que os teores de boro mais comumente determinados em amostras de microfertilizantes estejam na faixa de 1 a 15%, a remoção do último ponto da curva analítica em puro solvente não eliminou o efeito de matriz, comprovando que a suspeita de existência de interferentes nas análises de microfertilizantes afeta a assertividade do método espectrofotométrico.

Uma vez que curva analítica matrizada foi construída empregando uma amostra de microfertilizante com o menor teor de boro disponível na empresa, devido a inexistência de branco de amostra, os dados dessa curva podem ser utilizados para quantificar o teor de boro presente nessa amostra. Para isso, os dados obtidos da análise das soluções de boro da curva analítica matrizada foram usados para obtenção de uma curva analítica por adição de padrão (Figura 16), que consiste basicamente em realizar a subtração entre as absorvâncias de cada análise de soluções da curva analítica matrizada e a absorvância média das 6 replicatas das soluções do branco de reagente.

Figura 16 — Curva analítica por adição de padrão.



Fonte: Do autor (2021).

A Equação 25 apresenta a equação da reta para a curva analítica por adição de padrão, (Figura 16).

$$y = 1,5745x + 0,2352 \quad (25)$$

A curva analítica por adição de padrão apresentou um coeficiente de determinação R^2 de 0,9979 respeitando um dos critérios de linearidade. A partir dessa curva, por extrapolação (quando y é igualado a zero) e considerando o procedimento de preparo da amostra, incluindo as diluições realizadas, foi possível calcular a concentração real de analito presente na amostra de baixo teor. O valor obtido foi de 0,00746% de boro. Esse resultado apresentou-se satisfatório uma vez que os teores de microfertilizantes a base de boro presentes na empresa apresentam teores superiores a 1% de boro e o método foi capaz de detectar valores inferiores a 1%. Sendo assim a seletividade e sensibilidade do método foi comprovada.

4.4.2 Determinação do Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Para certificar qual a menor concentração, em %, m/m, que o método espectrofotométrico da azometina-H é capaz de determinar, os dados partir da curva analítica por adição de padrão foram empregados para estimar o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD). A partir das absorbâncias obtidas das análises das soluções do nível de concentração 0,0, ou seja, sem fortificação, calculou-se as respectivas concentrações pela equação da reta da curva por adição de

padrão. A Tabela 5 apresenta as absorvâncias e as concentrações estimadas pela equação da reta na concentração de fortificação de 0,0 mg/L.

Tabela 5 – Absorbância e concentração pela curva por adição de padrão.

Absorbância subtraída do branco reagente	Concentração pela curva por adição de padrão (mg/L)
0,206	-0,019
0,242	0,004
0,259	0,015
0,203	-0,020
0,252	0,010
0,261	0,016

Fonte: Do autor (2021).

A fim de determinar o LQ foram calculados a média e o desvio padrão das concentrações calculadas na Tabela 5. A concentração média obtida foi de 0,0012 mg/L e o desvio padrão foi de 0,0166 mg/L. Dessa maneira, foi possível estimar os valores de LQ pela substituição desses valores nas Equações 4, 5 e 6. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Limites de quantificação estimados.

	LQ (Equação 4)	LQ (Equação 5)	LQ (Equação 6)
(mg/L)	0,106	0,167	0,166
(% m/m)	0,005	0,008	0,008

Fonte: Do autor (2021).

A Tabela 6 mostra que o LQ calculado pela Equação 4 apresentou um resultado diferente em relação aos demais, isso ocorreu porque a partir da Equação 4 observa-se que os cálculos são realizados a partir da curva analítica, o que não é aplicado nas Equações 5 e 6. Dessa maneira optou-se pelos Limites de Quantificação calculados pelas Equações 5 e 6 realizando uma média entre esses valores para se obter o LQ. Como é de interesse análises de amostras com teores de

analito superiores a 1% m/m, o resultado para o limite de quantificação é satisfatório pois este valor representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Cabe ressaltar que o valor de LQ é concordante com o teor de boro determinado na amostra comercial de microfertilizante de baixo teor (item 4.4.1).

A partir do valor do LQ foi possível estimar também o limite de detecção (LD) a partir da Equação 7. O valor para LD obtido foi de 0,05 mg/L ou 0,0025 % m/m. Ao verificar o limite de detecção observa-se que a presença do analito é detectável nas concentrações de interesse do analito nas amostras

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram realizados ensaios a fim de implementar e propor a validação de um método espectrofotométrico utilizando a azometina-H para quantificar o teor de boro em microfertilizantes produzidos na Extrativa Fertilizantes.

Inicialmente, empregou-se uma comparação de métodos realizando-se ensaios em triplicata com soluções de ácido bórico em quatro níveis de concentração pelo método da azometina-H e por espectrometria de absorção de chama (FAAS). O método da azometina-H apresentou menor rigor na concentração de 1 %m/m de analito, provavelmente devido a erros no preparo de soluções, enquanto que a FAAS apresentou menor rigor quando comparada ao método espectrofotométrico. Ao nível de significância de 5%, entretanto, verificou-se que não há diferenças significativas entre os resultados dos experimentos realizados por ambos os métodos. Na sequência, o método espectrofotométrico da azometina-H foi aplicado com sucesso para quantificar o teor de boro em nove amostras comerciais de microfertilizantes, com diferentes concentrações.

Além disso, foram realizados alguns ensaios de validação para testar a eficiência do método espectrofotométrico utilizando a Azometina-H para quantificar o teor de boro em microfertilizantes produzidos na Extrativa Fertilizantes. Pelos ensaios de validação, a existência do efeito de matriz foi identificada, indicando que há interferência de constituintes das amostras que pode alterar a determinação do analito. A seletividade do método espectrofotométrico foi evidenciada pela coerência entre a determinação do teor de uma amostra comercial de baixo teor, pelo método de adição de padrão com o limite de quantificação estimado em 0,008%, empregando essa mesma amostra.

O método apresentou limites de quantificação e de detecção de 0,008 e 0,0024 %m/m, respectivamente. Esses resultados são satisfatórios, pois mostram alta sensibilidade considerando que as amostras analisadas na rotina apresentam teores de analito superiores a 1 % m/m.

Devido ao tempo de execução disponível para realização dos experimentos, não foi possível realizar uma validação completa, com ensaios de precisão do método, porém esse estudo poderá ser realizado posteriormente pela equipe do laboratório da empresa. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar seletividade e alta sensibilidade pela validação parcial do método de azometina-H para análise de boro em microfertilizantes. Sendo assim, cabe enfatizar que a continuação da validação e posterior implementação dessa metodologia analítica na rotina do

laboratório da empresa é possível, pois esse método mostrou-se confiável na aplicação das análises em amostras reais de microfertilizantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, José Carlos Vieira. **Atenção aos micronutrientes: O boro**, 2015. Disponível em: <<https://www.laborsoloacademy.com.br/plantas/atencao-aos-micronutrientes-o-boro/>> Acesso em: 12 dez. 2020.

ANDA, Associação Nacional para Difusão de Adubos. **Mercado de micronutrientes**, 2010. Disponível em: <<https://anda.org.br/wp-content/uploads/2018/10/MercadodeMicronutrientes.pdf>> Acesso em: 10 de nov. 2020.

ANDERSON, C.A. Noninfections (abiotic) diseases. **Minerals deficiencies and toxicities**. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, I.W., ed. Compendium of citrus diseases. St. Paul: APS Press, 1993. p.57-58.

BENZAN, Régis. **Validação de metodologia analítica para determinação de cromo e zinco em biossólido**, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/7010/4771.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 12 jan. 2021

BARROS, Cleide Bassani de. Validação de métodos analíticos. **Biológico. São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v64_2/barros.pdf> Acesso em: 10 Abr. 2021.

BARROS, Neto B.; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Unicamp, 2001.

BECHLIN, Marcos André. **Determinação de boro, enxofre e fósforo em plantas medicinais por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua**, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97852/bechlin_ma_me_araiq.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 12 dez. 2020

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial; Murilo Carlos Muniz Veras (Org.). Brasília: MAPA/SDA/CGAL, p. 220 P. 2017.

BRITO, N. M. et al. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, 2003. Disponível em: < <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/viewFile/3173/2546>> Acesso em: 13 dez. 2020.

CAPELLE, R. Microdosage colorimetrique du bore dans les aciers par l'emplol du reactif a l'azomethine h. **Analytica Chimica Acta**, v. 25, n. 1, p. 59-68, 1961.

CHAVES, Fernanda Santiago et al. Avaliação de procedimento de extração e determinação de boro em amostras de solo. **Embrapa Pecuária Sudeste-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48355/4/Boletim05.pdf>> Acesso em: 5 mar. 2021.

CHUI, Queenie SH; ZUCCHINI, Ricardo R.; LICHTIG, Jaim. **Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama**. Química Nova, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

CRUZ, André Camargo; PEREIRA, Felipe dos Santos; FIGUEIREDO, Vinicius Samu de. **Fertilizantes organominerais de resíduos do agronegócio: avaliação do potencial econômico brasileiro**. 2017.

FERREIRA, Gilvan Barbosa et al. Interferência de ferro na dosagem de boro no solo com azometina-H em soluções extratoras ácidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1311-1318, 2002.

FREIRE, Sérgio Miranda. **Estatística Básica**. 22 de fev. 2021. Disponível em: <http://www.lampada.uerj.br/arquivosdb/_book/bioestatisticaBasica.html> Acesso em: 20 de abr. 2021

GUPTA, U. C. **Boron nutrition of crops**. Advances in Agronomy, San Diego, New York, v. 31, p. 273-307, 1979a.

JMGAV, **Espectroscopia atômica (III): En el Laboratorio**, 2013. Disponível em: <<https://triplenlace.com/2013/01/03/espectroscopia-atmica-iii-en-el-laboratorio/>> Acesso em: 20 mar. 2021.

KASVI, **Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções**, 2018. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>> Acesso em: 23 fev. 2021.

KRUG, F. J. et al. **Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1: Fundamentos e atomização com chama**, 2004. Disponível em: <<https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1-revisada.pdf>> Acesso em 20 mar. 2021.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial; **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 05 de agosto 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf> Acesso em: 13 dez. 2020.

MALAVOLTA, E.; KLIEMAN, H. J. **Desordens nutricionais no cerrado**. Piracicaba: Potafos, 1985.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos**, 2015. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/manual-de-garantia-da-qualidade-analitica_2015.pdf> Acesso em: 10 abr. 2021.

MENGEL, K., KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Springer, Dordrecht, 2001. p. 1-13.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. **Engineering statistics**. 2.ed. John Wiley & Sons, 2009

REETZ, H. F. **Fertilizantes e o seu uso eficiente**. São Paulo: ANDA, 2017. Disponível em: <<https://www.ufla.br/dcom/wp-content/uploads/2018/03/Fertilizantes-e-seu-uso-eficiente-WEB-Word-Ouubro-2017x-1.pdf>> Acesso em: 05 nov. 2020

PERDONÁ, C. R.; CARVALHO, M. D. dos R.; RIELLA, H. G. **Determinação de boro em ulexita e colemanita naturais utilizando a técnica de absorção atômica em chama**. Anais do 45º Congresso Brasileiro de Cerâmica. Florianópolis, 2001.

RODRIGUEZ, O. **Aspectos fisiológicos nutrição e adubação dos citros**. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, R.F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S., ed. Citricultura brasileira. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.419-475.

ROSA, G.; GAUTO, M.; GONÇALVES, F. **Química Analítica: práticas de laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013.

SILVA, A. M. M.; GRANER, C. A. F. **Determinação de Boro em fertilizantes pela colorimetria de azometina-H modificada**. Departamento de Química. Instituto de Biociências (UNESP). Botucatu (SP): Ecl. Quím, 1996.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald; HOLLER, James; CROUCH, Stanley. **Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 9ª edição norte-americana**. Cengage Learning Brasil, 2015.

SOARES, I. M. de S. **Determinação de boro em fertilizantes minerais**, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/30909/7/Determina%C3%A7%C3%A3oDeBoro.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2020

SOARES, M. R.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. **Parâmetros termodinâmicos da reação de adsorção de boro em solos tropicais altamente intemperizados**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 1014-1022, 2005.

VELOSO, C. **Entenda o que é a ulexita e porque ela é uma fonte de boro vantajosa**, 2021. Disponível em: <<https://blog.verde.ag/nutricao-de-plantas/entenda-o-que-e-a-ulexita-e-porque-ela-e-uma-fonte-de-boro-vantajosa/>> Acesso em: 15 abr. 2021

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd ed. Weinheim: VCH, 1999. 941 p

ZARCINAS, B. A. **Suppression of iron interference in the determination of boron using the azomethine-H procedure**. Communications in soil science and plant analysis, v. 26, n. 5-6, p. 713-729, 1995.