



## TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BORO EN MATRICES BIOLÓGICAS

José Ramón Vielma-Guevara<sup>1, 2</sup>.

1. Unidad Educativa Privada “Colegio Santa Mariana de Jesús”, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.
2. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR), Santa Bárbara de Zulia, estado Zulia, Venezuela.

**Correspondencia:** Unidad Educativa Privada “Colegio Santa Mariana de Jesús”, Avenida Guajira, Parroquia Idelfonso Vásquez, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Teléfono: 261-7490444.

**Email:** [joravig@yahoo.com](mailto:joravig@yahoo.com) , [joravig2015@gmail.com](mailto:joravig2015@gmail.com)

### RESUMEN

La determinación de boro en suelo, plantas y muestras derivadas de seres humanos como suero o plasma, orina y huesos, puede ser realizada por una diversidad de técnicas analíticas que han mejorado con los avances en la instrumentación. Así se han descrito protocolos por espectroscopia de absorción atómica y emisión de llama, espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, análisis de activación de neutrones,



espectroscopia con plasma acoplado inductivamente, espectrometría de masas y espectrofotometría de absorción molecular. De éstas, la determinación del no metal utilizando la técnica de la azometina-H, ofrece ventajas comparativas frente a las demás técnicas utilizadas, cuando se desea su estimación en muestras biológicas de humanos. La hipótesis de trabajo que plantea que el déficit o alteraciones en elementos traza o ultra trazas en seres humanos, pudiesen jugar un papel en la génesis de una enfermedad compleja y multifactorial, como la osteoporosis (como el boro y el estroncio), permanece bajo estudio. De igual forma se ha señalado al boro y al estroncio como posibles nuevos biomarcadores óseos. El objetivo de la presente revisión, es describir las principales técnicas utilizadas para la determinación de boro en matrices biológicas, señalando las principales y ventajas de cada una.

**PALABRAS CLAVE:** boro, azometina-H, espectroscopia de absorción atómica en llama, espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado por inducción.

## **TECHNIQUES USED FOR THE DETERMINATION OF BORON IN BIOLOGICAL MATRICES**

### **ABSTRACT**

The determination of boron in soil, plants, and human-derived samples such as serum or plasma, urine, and bone, can be performed by a variety of analytical techniques that have improved with advances in instrumentation. Thus, protocols have been described by atomic absorption spectroscopy and flame emission, atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization, neutron activation analysis, inductively coupled plasma spectroscopy, mass spectrometry and molecular absorption spectrophotometry. Of these,



the determination of nonmetal using the azometin-H technique offers comparative advantages compared to the other techniques used, when its estimation is desired in biological samples from humans. The working hypothesis that the deficit or alterations in trace or ultra-trace elements in humans could play a role in the genesis of a complex and multifactorial disease, such as osteoporosis (such as boron and strontium), remains under study. Similarly, boron and strontium have been identified as possible new bone biomarkers. The objective of this review is to describe the main techniques used for the determination of boron in biological matrices, pointing out the main and advantages of each one.

**KEY WORD:** boron, azometin-H, flame atomic absorption spectroscopy, induction coupled plasma atomic emission spectroscopy.

## INTRODUCCIÓN

La hipótesis de trabajo que señala el posible vínculo de elementos traza o ultra-traza a una enfermedad tan compleja como la osteoporosis, constituye una excelente línea de investigación, aún por abordar. Tanto en plantas como en animales, el boro es capaz de formar enlaces puentes di-ésteres con grupos cis-diol; y una de sus funciones en el metabolismo del hombre es la hidroxilación de la vitamina D,

hasta su forma “hormonalmente” activa que es el Calcitriol. Esta reacción ocurre en las mitocondrias de las células de los riñones, en donde además de un suministro continuo de boro, se requiere de la presencia del oxígeno, magnesio, NADPH y el citocromo P450. Al ser un elemento que el cuerpo humano no puede sintetizar, su ingestión a través de agua y alimentos es muy importante. Parece existir una relación entre la osteoporosis (una enfermedad crónica, silenciosa y tratable



quimioterapéuticamente) y los niveles de boro (1-4). Por su parte el estroncio (Sr), es el metal alcalinotérreo menos abundante en la naturaleza, sus principales fuentes son la celestina y la estroncianita. El ingreso ocurre principalmente por el consumo de agua y alimentos de forma natural; otra vía es la inhalación de polvos de estroncio sin riesgo para la salud humana, hasta miles de partes por millón (ppm). Medicamentos a base de sales de Sr y particularmente del ranelato de Sr, permiten un intercambio dosis dependiente del metal por el calcio, en una proporción de 10:1, sin alterar las propiedades óseas. En general los compuestos hidrosolubles de Sr pueden llegar a ser más tóxicos en comparación a los liposolubles. Altas dosis del cromato de estroncio y el isótopo radioactivo  $^{90}\text{Sr}$  (útil en reactores nucleares) pueden llegar a generar cáncer y comprometer la vida humana (5). En este sentido, tanto el boro como el estroncio, han sido sugeridos como

posibles nuevos biomarcadores de metabolismo óseo o biomarcadores en estudio (2, 6).

La osteoporosis es una enfermedad de etiología multifactorial, compleja, dependiente de aspectos como la raza, el estado nutricional e inmunológico del individuo, la edad, la predisposición genética, el consumo de medicamentos como glucocorticoides (prednisona), anticonvulsivantes, terapia con otros inmunosupresores diferentes a los glucocorticoides (como la ciclosporina A, por ejemplo), entre muchos otros. A todo esto, se le suma el estrés, la depresión, enfermedades de base como el hipertiroidismo, síndrome de Cushing; la disminución fisiológica de los estrógenos por la menopausia, amenorreas, déficit de testosterona en los hombres, hábitos de vida consistentes con el exceso del tabaco, consumo de bebidas alcohólicas, solo por nombrar los aspectos más frecuentes. Dilucidar la etiopatogenia de la enfermedad en los seres humanos es muy difícil por la gran



cantidad de variables en simultáneo que se deben controlar (y en muchos casos son casi imposibles de controlar); por esta razón, los modelos alternos como los sistemas celulares *in vitro* y sobre todos los modelos murinos ovariectomizados (modelos *in vivo*) ofrecen una gran alternativa, pero hay que considerar que un hallazgo o mecanismo vinculado a la osteoporosis obtenido por experimentos *in vitro*, no se podría extrapolar necesariamente al modelo *in vivo* (o tener el efecto contrario, por ejemplo) y más aún debe ser validado en seres humanos. Cada día, la información sobre el tópico de la fisiopatología en la osteoporosis crece vertiginosamente; sin embargo, la totalidad de sus causas y las vías de señalización e interconexiones celulares no están totalmente esclarecidas (2, 7).

El boro (B) es un elemento esencial para las plantas y su esencialidad en el hombre se encuentra en discusión, su principal vía de ingreso al organismo es la digestiva, principalmente a través de la

ingesta de frutas, vegetales, agua y de algunos productos de origen animal. También puede ingresar por vía respiratoria y su absorción por la piel es cuestionable, a parte su absorción gastrointestinal en general es rápida y completa, aunque depende del tipo de compuesto ingerido. Una vez absorbido el B es distribuido por vía sanguínea al hígado, piel, huesos, bazo, corazón y riñón; se elimina fundamentalmente a través de la orina y en pequeñas cantidades por el tracto gastrointestinal (1-4).

El objetivo del presente trabajo es describir las técnicas empleadas para la determinación de B en diferentes matrices biológicas, señalando las principales ventajas y desventajas de cada técnica útil para este propósito.

## PERSPECTIVA HISTÓRICA

La concentración de boro se ha determinado utilizando espectroscopia de absorción atómica y emisión de llama



(AAS y AES), espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), análisis de activación de neutrones (NAA), plasma acoplado inductivamente (ICP) AES y espectrometría de masas (MS), y espectrofotometría de absorción molecular (8). La determinación del elemento por las técnicas AAS y AES generalmente requiere la separación del boro de la matriz de la muestra, para obtener resultados adecuados (9), éstas tienen problemas por: el efecto de memoria, las interferencias, desviación de la calibración, el ruido de fondo y su sensibilidad es a menudo pobre para muchas de las aplicaciones (10).

La técnica ETAAS es una de las asignaciones más difíciles para las determinaciones de boro, ya que este elemento forma compuestos de alta estabilidad térmica (óxidos, nitruros y carburos) durante el análisis. Por esta razón, ésta técnica tiene graves efectos de memoria, un bajo límite de detección y de sensibilidad. Una manera de superar

éstas dificultades y mejorar el rendimiento de ETAAS es mediante el uso de modificadores químicos (8).

La NAA implica varias técnicas, como la espectrometría de masas de activación de neutrones (NA-MS), la radiografía de captura de neutrones (también llamado  $\alpha$ -track grabado), perfiles de profundidad de neutrones (NDP), siendo este último el más utilizado de todos. A pesar de que las técnicas NAA son no destructivas y con la capacidad de gestión para muestras sólidas y detección multi-elemental; exigen el acceso a un reactor nuclear y consumen mucho tiempo, lo que las hace imprácticas, con un mero significado académico, debido a que su detectabilidad no es sensible para la determinación del boro (8, 11-12).

Muchas de las limitaciones existentes sobre las determinaciones de boro, se han mejorado con la introducción de fuentes de plasma (por ejemplo, plasma acoplado inductivamente, ICP) acoplado con una técnica de detección muy



sensible tal como MS y AES que dan lugar a potentes metodologías tales como ICP-MS e ICP-AES. Algunos desarrollos metodológicos para las determinaciones de boro empleando ICP-AES se han aplicado en las plantas (13) y en el análisis de suelos (14). La principal limitación para la determinación de boro por ICP-AES en plantas y particularmente en la matriz de suelos con alto contenido de hierro, es el hecho de que el hierro tiene líneas de emisión a 249,77; 249,65 y 249,70 nm, que producen interferencias espectrales para las líneas más sensibles de nacimiento a 249,77 y 249,67 nm (8). En el curso de los últimos años, el ICP-MS ha mostrado un creciente interés por parte de muchos investigadores para la determinación de boro en una diversidad de materiales con especial interés en muestras biológicas. Las ventajas de la ICP-MS sobre otras técnicas son una mayor sensibilidad, límites de detección más bajos y mediciones simultáneas de concentraciones de boro y de las

proporciones de los isótopos del boro ( $^{11}\text{B}$  a  $^{10}\text{B}$ ). Sin embargo, un requisito para la aplicación de éstas técnicas es que las muestras deben estar en un estado desintegrado porque incluso partículas pequeñas obstruyen el tubo capilar que va al nebulizador. También, un pre-tratamiento cauteloso de las muestras es necesario para la eliminación de la mayoría de los componentes de la matriz; estos incluyen la vaporización electrotérmica para la introducción de analito al plasma, la evaporación de algunos de los componentes de la matriz por tratamiento con una mezcla de HCl y KF o el uso de líneas de boro menos sensibles, que obviamente deteriorará la sensibilidad. Medir el boro en los niveles de ultra-traza por ICP-MS también está plagado de graves efectos de memoria que podrían minimizarse por dilución de las muestras con manitol + amoníaco, la introducción de solución de amoníaco simultáneamente con la muestra justo antes del nebulizador, o por inyección de gas amoníaco en la cámara de



pulverización durante el análisis (8). La mayor limitación de ésta técnica para muestras de suelos, plantas y aún para muestras derivadas de seres humanos es que requiere de un instrumental muy costoso y su uso de rutina es poco factible.

La espectrofotometría es esencialmente una técnica analítica para elementos trazas y es una de las herramientas más poderosas en el análisis químico con una instrumentación de muy bajo costo de adquisición y operación, así como de disponibilidad mundial. Una amplia variedad de reactivos que forman un complejo coloreado o fluorescente con el boro tienen uso para la determinación espectrofotométrica del elemento (8, 15). Algunos de los reactivos más utilizados incluyen la curcumina, el azul de metileno, quinalizarina, cristal violeta, ácido cromotrópico, ácido carmínico y **la azometina-H** (8). Entre ellos, el último constituye la elección en cuanto a las técnicas espectrofotométricas se refiere para la

determinación de boro. Esta técnica es más confiable, rápida, sencilla, sensible y conveniente en comparación a las otras técnicas colorimétricas utilizadas para la determinación de boro en suelo, plantas y muestras de seres humanos. Además, no se requieren ácidos concentrados, lo que lo hace deseable para la automatización. El principal inconveniente de la azometina-H para la determinación del boro en el suelo y en las plantas es debido a la presencia de varias especies incluyendo: Al, Cu, Fe, Zn, Ni y Co. El color de la muestra (especialmente en los extractos de suelos) y los altos niveles de Fe pueden causar interferencia severa y una amplia variabilidad en las lecturas de absorbancia. La presencia de hierro aumenta la señal analítica de la azometina-H. Estas interferencias del hierro y otras especies, pueden ser suprimidas por la adición de ADTA, ácido EDTA + tioglicólico, EDTA + manitol, EDTA + ácido nitriloacético y el ion polifosfato + tiourea + ácido





ascórbico; sin embargo, el uso de estos agentes quelantes reduce la sensibilidad del azometina-H. Estas interferencias y la pérdida de sensibilidad limitan la aplicación de la técnica de la azometina-H al suelo y las plantas para muestras con bajas concentraciones de boro y matrices complejas. En estos casos, el uso de una separación previa del boro parece ser necesario para aislarlo del resto de la muestra y obtener valores confiables (8).

De lo expuesto anteriormente, se puede inferir que la gran mayoría de las determinaciones de boro son realizadas en muestras de plantas y suelos. Al respecto Malavé-Acuña en el año 2005 (16) explica que los rangos de concentración para boro en solución del suelo que causan síntomas de deficiencia o toxicidad en las plantas son más pequeños que para cualquier otro elemento; esto, aunado a la situación de que dichos rangos varían de acuerdo con la especie; es decir, un intervalo de concentraciones de B puede ser normal para un determinado tipo de plantas,

mientras que para otras puede resultar tóxico o deficiente, ha tenido una profunda influencia para un mejor conocimiento del comportamiento del B en los suelos. Los factores del suelo que afectan la biodisponibilidad de B para las plantas son: pH, textura, humedad, contenido y calidad de la materia orgánica y el tipo y contenido de arcillas. Generalmente la concentración de B de la solución del suelo está controlada por reacciones con superficies adsorbentes que incluyen óxidos de aluminio y hierro, hidróxido de magnesio, minerales de arcilla, carbonato de calcio y materia orgánica. Estas reacciones de retención de B pueden ser descritas usando modelos empíricos (la ecuación de isoterma de adsorción de Langmuir, la ecuación de isoterma de adsorción de Freundlich y el modelo fenomenológico de Keren) o modelos químicos (el modelo de capacitancia constante, el modelo de triple capa y el modelo de cuádruple capa) que pueden usar condiciones cambiantes de la solución en



cuanto a pH y concentración de B. Estos modelos también pueden ser usados para describir reacciones de liberación de B para suelos aún fértiles. Un número de técnicas analíticas han sido utilizadas para determinar concentraciones de B en diferentes tipos de materiales siendo los métodos espectrofotométricos, que utilizan azometina-H, los más extensivamente aplicados en los análisis de muestras de suelos.

Malavé-Acuña y Carrero-Molina en 2007 (17) sostiene que a pesar que hace nueve décadas que se demostró la esencialidad del boro para el normal crecimiento de las plantas, hasta ahora su rol bioquímico no está bien definido. El boro es un importante micro-nutriente con un difícil manejo debido a que su movilidad en el floema varía marcadamente entre las especies vegetales con síntomas de deficiencia y toxicidad en un rango bastante estrecho. Durante los últimos años numerosas investigaciones han contribuido a mejorar la comprensión acerca del rol del

boro en las plantas. Las recientes revisiones proponen que este elemento está involucrado en tres procesos principales que incluyen: preservación de la estructura de la pared celular, mantenimiento de las funciones de la membrana celular y finalmente como cofactor de las actividades metabólicas. Ha sido hipotetizado que el rol primario del boro en todo sistema consiste en estabilizar moléculas de importancia biológica mediante la formación de puentes di-ésteres con grupos cis-diol independientemente de la función de cada una de ellas (18). Esta capacidad particular del átomo de boro radica en su química, la cual no sería posible para otros átomos tales como fósforo o azufre, que, aunque puedan formar uniones a través de puentes di-ésteres, la estructura molecular resultante sería inestable debido a una densidad electrónica marcadamente grande propia de los átomos más pesados (17).

## TÉCNICAS

### ESPECTROFOTOMÉTRICAS



### **Estandarización de la determinación de boro con el uso de la azometina-H.**

Carrero et al., en el año 2005 (8) desarrolló un sistema de flujo continuo para la determinación de boro en muestras de suelos y plantas con detección espectrofotométrica utilizando la técnica del complejo de azometina-H-boro. Para lograr este objetivo, estos mismos autores describen previamente un inyector simple y flexible basado en el tiempo para la introducción de casi cualquier volumen deseable de muestra y reactivos en sistemas de flujo. La viabilidad de la aplicación se demuestra mediante la mejora de la técnica espectrofotométrica de la azometina-H para la determinación precisa y exacta del boro en el suelo y los tejidos de las plantas del café. Las funciones programadas en línea incluyen: inyecciones secuenciales y captura de zonas, con una reducción significativa del consumo de muestras y de reactivos (19).

Con el fin de evitar las interferencias de los concomitantes presentes en las muestras y aumentar la sensibilidad, el boro se separó en línea de la matriz, por generación de borato de metilo. Para este propósito, se combinó la muestra con una solución de ácido sulfúrico concentrado con metanol, en una proporción de 1: 3, que produjo suficiente calentamiento para la reacción de esterificación sin fuente externa. Posteriormente, el borato de metilo producido se añadió mediante la adición de un flujo de nitrógeno y se separó de la solución en masa, en un separador gas-líquido, para ser luego hidrolizado en una solución tamponada de fosfato de amonio a pH 6,8. Finalmente, la nueva masa de fases se separó en un segundo separador gas-líquido y la fase líquida se combinó con la azometina-H para formar un complejo de boro para su detección a 420 nm. Los efectos de una serie de posibles interferentes, tanto aniónicos y catiónicos fueron evaluados. Las depresiones más severas fueron causadas



por fluoruro y potasio, para los cuales una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  causó una depresión del 5% en la señal. Se obtuvo una respuesta lineal entre el límite de detección de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $3 \sigma$  del blanco) y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de boro. La precisión (R.S.D. %) para 10 lecturas consecutivas de la misma solución ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de boro) fue de 2,6%. Las recuperaciones de boro añadido a las muestras antes del proceso de extracción fueron de 94, 97 y 101% para suelos, tejidos de fruta y tejido foliar, respectivamente (8). El sistema desarrollado fue aplicado a la determinación de boro en suelo, tejido de frutas, y hojas de tejido de plantaciones de café de diferentes poblaciones del estado de Mérida, Venezuela.

Empleando la metodología descrita anteriormente, Malavé et al., en el año 2009 (20) determinaron el estatus de boro en plantaciones de café (*Coffea arabica* L.) de Venezuela; para lo cual se muestrearon dos localidades cafetaleras. Con veinte unidades experimentales por

área se tomaron muestras de plantas de café y sus respectivos suelos en las localidades de Santa Cruz de Mora (estado Mérida) y Caripe (estado Monagas), durante la época de cosecha para determinar el contenido de boro sin el suministro de algún aditivo contentivo del elemento en estudio. Las muestras de suelos y tejidos de plantas se trataron mediante un procedimiento de extracción en caliente con ácido nítrico previo a la determinación espectrofotométrica de boro con azometina-H usando un sistema de flujo continuo (8). El tratamiento estadístico de los datos obtenidos para el contenido del elemento en las muestras de frutos y hojas fueron  $24,96 \pm 2,39$ ;  $75,86 \pm 2,79 \mu\text{g g}^{-1}$  masa seca (Santa Cruz de Mora) y  $9,56 \pm 1,12$ ;  $29,08 \pm 2,15 \mu\text{g g}^{-1}$  masa seca (Caripe) respectivamente, los cuales muestran diferencias significativas en el contenido de boro tanto entre localidades como entre tejidos ( $p < 0,001$ ), mientras que en suelos fueron  $9,08 \pm 1,38 \mu\text{g g}^{-1}$  (Santa Cruz de Mora) y  $4,42 \pm 0,95 \mu\text{g g}^{-1}$



<sup>1</sup> masa seca, los cuales muestran diferencias significativas entre localidades ( $p < 0,001$ ). Estos resultados indicaron valores de referencia para el contenido del elemento mayores en Santa Cruz de Mora (estado Mérida) que en Caripe (estado Monagas).

#### **Otras técnicas espectrofotométricas.**

Para muestras de agua potable y aguas residuales, Solís-Cuñez en Ecuador en el año 2013 (21) valida técnicas analíticas para la determinación de boro, fluoruros y nitritos mediante espectrofotometría de luz visible. Los protocolos empleados para la determinación del boro fueron: técnica 4500-BC. Carmínico (Standard Methods APHA) y la técnica 8015 Carmine Method Powder Pillows (Handbook HACH DR2800). En ambas metodologías en presencia del boro, una solución de carmín o ácido carmínico en ácido sulfúrico concentrado, vira de rojo brillante a un rojo azulado o azul, en función de la concentración de boro presente en las muestras. A partir del análisis cualitativo se determinó el límite

de detección (LD) de boro 0,1 mg/L. La técnica es capaz de detectar cantidades mínimas de boro en una muestra, siempre que estén sobre la concentración de 0,1mg/L. La concentración mínima de boro que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables en condiciones experimentales indicadas es de 0,5 mg/L. A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación (LC) 0,5 mg/L, de esta forma se estableció que la técnica es capaz de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de boro en una muestra, siempre que tengan una concentración igual o mayor 0,5mg/L. Con el límite de cuantificación se establece el rango de trabajo, bajo: 0,5-1,0 (mg/L) y alto: 1,0-10,0 (mg/L). Se comprobó el cumplimiento de la linealidad de la técnica por su elevado valor del coeficiente de determinación  $r^2 > 0,99$  en una recta del tipo  $y = m x + b$ ; y por obtener un  $t \text{ calc.} > t \text{ tab.}$  De igual manera, existe repetitividad y



reproducibilidad en la técnica de determinación de boro para los rangos altos y bajos, por tener una  $f_{calc.} > f_{tabla}$ , no se puede guardar la curva de calibración en el software, y se requiere realizar una previamente a la lectura de las muestras. La precisión obtenida tiene un  $L_r$  y  $L_R$  de 0,2-0,9 en todo el rango. La exactitud de la técnica analítica cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación teniendo un rango de recuperación del 80-120%, indicado por el MRC utilizado. Por todo lo anterior ambos protocolos son válidos (exactos, precisos y confiables) para la determinación de boro en muestras de agua.

Otros grupos ecuatorianos han utilizado las técnicas espectrofotométricas basados en el carmín para la determinación de boro, cinc y potasio para muestras de agua en el centro de investigaciones y control ambiental (CICAM, siglas en español) con sede en Quito. Con respecto al boro, la técnica se utilizó en un intervalo de 1 hasta 100

mg/L. La técnica satisface los objetivos planteados en cuanto a recuperación, precisión e incertidumbre. Los resultados finales reportaron una incertidumbre de 12% y coeficientes de variación, de reproducibilidad y repetibilidad menores al 5%, lo cual está en concordancia con la norma NTE INEN-ISO/IEC 17025 (22).

### TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS

El boro forma compuestos fluorescentes con un número de reactivos en ácidos concentrados, así como en condiciones más suaves. Las diferencias en las técnicas fluorimétricas reportadas se deben principalmente a la elección de los reactivos utilizados para la reacción. La técnica fluorimétrica FI y la técnica espectrofluorimétrica para tejidos vegetales, fertilizantes y las aguas naturales se emplean para la determinación de boro a una longitud de onda constante de 24 nm, utilizando ácido cromotrópico como reactivo fluorimétrico. Otros métodos que



utilizan el reactivo Alizarin Red S (la sal sódica de 1,2-dihydroxiantraquinona-3-sulfónico) poseen un límite de detección de 0,34 mg/mL para la determinación de boro y un límite de detección de 7,2 ng/mL, para el caso de la determinación simultánea de B y Mo. Sin embargo, la técnica es sensible al pH ya la temperatura y sufre de interferencias de una serie de especies químicas (23).

#### **Otra aproximación espectrofotométrica.**

Validada desde las décadas de 1950-1960 para la determinación del boro se realizó por medio de la reacción del ácido bórico con el reactivo alizarinsulfonato sódico. El reactivo es muy estable en ácido sulfúrico concentrado, pudiendo prepararse en gran cantidad, como ya había propuesto Dickinson para su conservación en recipientes de vidrio de bajo contenido en boro. Con el ácido bórico forma un complejo muy estable a la temperatura ordinaria y cuyo tiempo de formación,

según fue comprobado, se aproxima a las 20 horas. Las sustancias interferentes, son eliminadas por destilación continua del boro como éster metil-bórico y en la ulterior calcinación. La recuperación media del boro en el aparato de destilación fue del 99,36%, y la del boro añadido a muestras de nitrato de uranilo, del 96,4%. Finalmente, se realizaron determinaciones en minerales y varios reactivos, obteniendo resultados concordantes en determinaciones múltiples que comprueban, junto con la recuperación del boro, la utilidad de la técnica descrita (24).

#### **DETERMINACIÓN DE BORO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA**

Burguera et al., en el año 2001 (25) realizaron un estudio comparativo de varios posibles modificadores químicos (Au, Ba, Be, Ca, Cr, Ir, La, Lu, Mg, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, Sr, V, W y Zr) (Zr, W y W + Rh) de la plataforma de grafito pirolítico de un atomizador de tubo de



grafito calentado longitudinalmente para la estabilización térmica y la determinación de boro en muestras de hueso, orina y sangre completa. El uso de Au, Ba, Be, Cr, Ir, Pt, Rh, Ru, Sr y V como modificadores y del recubrimiento W + Rh produjo señales erráticas y ruidosas, mientras que la adición de La, Ni y Pd como modificadores, y el revestimiento W tuvo efectos positivos, pero con señales de absorción de fondo demasiado altas, haciendo su uso inadecuado para la determinación de boro incluso en soluciones acuosas. La señal de absorción atómica para el boro se incrementó y se estabilizó cuando la plataforma se recubrió con Zr, y por adición de Ca, Mg, Lu, W o Zr como modificadores. Sólo la adición de 10 µg de Zr como modificador sobre plataformas tratadas con Zr permitió el uso de una temperatura de pirólisis más alta sin pérdidas del analito. El efecto de memoria se minimizó incorporando un paso de limpieza con 10 µL de HF de NH<sub>4</sub>F de 50 g L<sup>-1</sup> después de cada tres

mediciones de boro. La adición de 10 µL de ácido cítrico 15 g L<sup>-1</sup> junto con Zr sobre plataformas tratadas con Zr mejoró significativamente la masa característica a  $m_0 = 282$  pg, lo cual es adecuado para muestras biológicas tales como la orina y el hueso, aunque la sensibilidad era todavía inadecuada para la determinación de boro en sangre de sujetos sin dieta complementaria. En condiciones optimizadas, el límite de detección ( $3\sigma$ ) fue de 60 µg L<sup>-1</sup>. La cantidad de boro encontrada en muestras de sangre completa, orina y cabeza de fémur de pacientes con osteoporosis estuvo de acuerdo con valores previamente reportados en la literatura. Con esta metodología se pueden procesar especímenes de humanos (sangre total, hueso y orina) por ETAAS utilizando zirconio y ácido cítrico como modificadores.

Como alternativa a la técnica de la AOAC 982.01 para la determinación de boro soluble en ácido y agua, utilizando soluciones de trabajo desde 0 a 45 ppm y





el reactivo de la Azometina-H; el grupo de Sánchez y col., en el año 2003 (26) desarrollan una alternativa a la técnica espectrofotométrica de la AOAC 982.01, para la determinación del elemento en fertilizantes orgánicos líquidos por espectrometría de emisión atómica utilizando una llama de óxido nitroso-acetileno, a una longitud de onda de 249,7 nm. Esta técnica puede aplicarse para concentraciones de boro de 0,1 a 2,0% w/w. Los resultados mostraron una desviación del 1% con respecto a la técnica oficial.

En este punto y con un fin meramente didáctico, aclararemos la diferencia entre éstas dos últimas metodologías de trabajo: cuando se utiliza la absorción atómica se vaporiza una muestra por medio de una flama y se le hace pasar un rayo de luz blanca a través de esa flama con los átomos vaporizados, esa luz se hace pasar después por un prisma y lo que se obtiene es un espectro continuo pero con rayas oscuras en diferentes longitudes de onda, ese espectro es leído

por un equipo espectroscópico y la información procesada por una computadora. Entre tanto, la emisión atómica consiste en excitar a una muestra de átomos por medio de un arco eléctrico o una flama de alta temperatura. La luz que emiten estos átomos excitados es llevada a un prisma y recogida por un espectroscopio obteniendo un espectro discontinuo. Este espectro es interpretado por una computadora. En palabras más sencillas, en la espectrofotometría de absorción atómica, los átomos en fase de vapor absorben radiaciones energéticas correspondientes a sus líneas de resonancia (UV-VIS), en cantidad proporcional a su concentración. La técnica se caracteriza por su sencillez, rapidez y selectividad.

**La espectrofotometría de emisión atómica.** Consiste en el análisis de la radiación emitida, luego de que los átomos se han excitado por acción de la flama.



Servant y col., en el año 2010 (27) describen la validación de una técnica para la determinación de boro, manganeso, molibdeno y vanadio mediante ICP-OES en aguas de zonas mineras a restituir en Argentina, con el objetivo de conocer los niveles de base de éstos elementos a la hora de iniciar, durante y después de la aplicación de un proceso de remediación. La técnica de ensayo solo requiere un pre-tratamiento de la muestra que incluye filtrado a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  y el acondicionamiento con  $\text{HNO}_3$  en una fracción del volumen de 0,2%. Las determinaciones se realizaron en un espectrómetro de emisión atómica de plasma inductivo de argón Perkin Elmer 5100 DV, axial, con detector de estado sólido, nebulizador de flujo cruzado asociado a cámara de expansión tipo Scott y auto-muestreador tipo AS.

Para la preparación de muestras de carburo de silicio (SiC) se utilizó la pirohidrólisis y se realizó determinación de boro mediante espectrometría de

emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Parámetros importantes para la pirolisis como la temperatura, caudales de aire y agua, tiempo de reacción y uso de  $\text{V}_2\text{O}_5$  fueron evaluados. De igual forma, se realizó un estudio de interferencia espectral W sobre líneas de emisión del boro para la determinación por ICP-OES. La precisión se evaluó utilizando material de referencia certificado (CRM BAM S003) y se obtuvo un valor de sesgo inferior al 1% entre el valor certificado y el determinado. El límite de detección (LOD) de 0,010  $\mu\text{g g}^{-1}$  se obtuvo utilizando pirohidrólisis y ICP-MS. La pirohidrólisis es una técnica de preparación de muestras muy sencilla que permite el uso de agua desionizada como solución absorbente para la determinación de B en SiC (28).

#### **DETERMINACIÓN DE BORO POR AUTORADIOGRAFÍA POR CAPTURA NEUTRÓNICA**



Con ésta técnica se evaluó el coeficiente de absorción de boro en hojas jóvenes de plantas de café (variedad Caturra), en dos experimentos realizados en abril y noviembre de 1996. Dicho coeficiente osciló entre 0,9 y 5,3 nmol/h. También se estudió la concentración de boro natural en hojas de café tomando en cuenta edad, sintomatología y tratamiento recibido, utilizando la misma técnica (29).

Han sido reportados una serie de técnicas analíticas de reacción nuclear (NRA) para las mediciones de boro. Algunos de éstas técnicas pueden tener un mero significado académico, poco valor práctico para la determinación de boro de rutina. Éstas implican el bombardeo de los núcleos de boro y la medición del (de los) producto (s) de reacción. Por conveniencia, las técnicas NRA reportadas se dividen en dos clases: (a) análisis de activación de neutrones (NAA) y (b) otras técnicas NRA. Para el análisis de activación neutrónica en general, la muestra es bombardeada con neutrones, se hacen los elementos de

interés radioactivos y la cantidad del elemento se determina midiendo la radioactividad o los productos de descomposición radiactiva. El NAA es una técnica no destructiva, capaz de manejar muestras sólidas, con capacidad de detección de elementos múltiples y límites de detección generalmente bajos. No obstante, no es adecuada para volúmenes de masa o de líquido de muestra que representen una fuga radioactiva después de la activación (23).

#### **PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES FINALES**

Nuestro grupo de investigación fue pionero en Venezuela en la determinación de boro en muestras de orina de 2 horas de mujeres posmenopáusicas con y sin osteoporosis. La pérdida de fósforo y boro fue significativamente mayor en el grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis ( $p < 0,005$ ). Dicho resultado fue corroborado con los índices de excreción urinario B/Cr, P/Cr, Mg/Cr, Ca/Cr (1-3). La técnica empleada fue la



ICP-AES, que ofrece un costo muy elevado, por el equipo necesario. Sin embargo, la estandarización del protocolo de determinación de boro con azometina-H empleando un flujo continuo (8, 19) y utilizado en tejidos vegetales como plantaciones de café (*Coffea arabica* L) en dos comunidades del país (20), nos permitieron afirmar su potencial uso en muestras de humanos: como orina de 24 horas, orinas parciales, suero, plasma, hueso, con el propósito de continuar dilucidando el papel del boro en la etiología de enfermedades crónicas como la osteoporosis.

## REFERENCIAS

1. Mora M, Vielma JR. Boro en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. [Trabajo especial de grado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 2000, p31. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/44489120\\_Boro\\_en\\_mujeres\\_postme](https://www.researchgate.net/publication/44489120_Boro_en_mujeres_postmenopausicas_con_osteoporosis_Marylu_Mora_Jose_Vielma)
2. Vielma JR, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV, Delgado Y, Picón-Borregales D, Chirinos RC. Boro y osteoporosis, tratamiento y biomarcadores de metabolismo óseo. 1 era Ed. Editorial Académica Española, ISBN-10: 3841757901. 2016, 188 p.
3. Vielma JR, Mora-Mora M, Alarcón-Corredor OM, Hernández G, Linares L, Urdaneta-Romero H, Arévalo González E. Estudio comparativo de la excreción urinaria de boro, calcio, magnesio y fósforo en mujeres posmenopáusicas con y sin osteoporosis. *Invest Clin* 2012; 53: 3-15.
4. Vielma JR, Picón-Borregales D, Vergara MA, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV. El boro, un elemento benéfico que ayuda a prevenir la osteoporosis en el humano: una revisión de literatura. *Avan Biomed* 2017; 6 (3): 216-226.
5. Picón-Borregales D, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV, Vielma JR. Relación



del estroncio con el metabolismo mineral óseo y la osteoporosis. Una revisión de la literatura. *Avan Biomed* 2017; 6: 133-143.

6. Vielma JR, Picón-Borregales D, Lara N, Gutiérrez-Peña L. Biomarcadores de metabolismo óseo y su utilidad en la osteoporosis. *Acta Bioclínica* 2019; 9 (7): 155-187.

7. Vielma JR, Picón D, Gutiérrez LV, Lara ND. Pathophysiology of osteoporosis: genes, oxidative stress and immunopathogeny. A qualitative systematic review. *Avan Biomed* 2018; 7: 100-111.

8. Carrero P, Malavé A, Rojas E, Rondón C, de Peña YP, Burguera JL, Burguera M. On-line generation and hydrolysis of methyl borate for the spectrophotometric determination of boron in soil and plants with azomethine-H. *Talanta* 2005; 68 (2): 374-381.

9. Botelho GMA, Curtius AJ, Campos RC. Determination of boron by electrothermal atomic absorption

spectrometry: testing different modifiers, atomization surfaces and potential interferences. *J Anal At Spectrom* 1994; 9 (11): 1263-1267.

10. Papaspyrou M, Feinendegen LE, Mohl C, Schwuger MJ. Determination of boron in cell suspensions using electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1994; 9 (7): 791-795.

11. Iyengar GV, Clarke WB, Downing RG. Determination of boron and lithium in diverse biological matrices using neutron activation-mass spectrometry (NA-MS). *Fresenius J Anal Chem* 1990; 338 (4): 562-566.

12. Lamaze GP, Downing RG, Piliore L, Badzian A, Badzian T. Analysis of boron in CVD diamond surfaces using neutron depth profiling. *Appl Surf Sci* 1993; 65-66: 587-592.

13. Novozamsky I, Houba VJG, van der Lee JJ, van Eck R, Mignorance MD. A convenient wet digestion procedure for multielement analysis of plant materials.



- Commun Soil Sci Plant Anal 1993; 24 (19-20): 2595. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/00103629309368980>.
14. Sun DH, Waters JK, Mawhinney TP. Determination of total boron in soils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using microwave-assisted digestion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 12, n. 15-16, p. 2493-2503, 1998.
15. Novozamsky I, Vaneck R, Vanderlee J, Houba V, Ayaga G. Continuous flow technique for generation and separation of methyl borate from iron-containing matrices with subsequent determination of boron by ICP-AES. *At Spectrosc* 1998; 9(1): 97-99.
16. Malavé-Acuña A. Los suelos como fuente de boro para las plantas. *Revista UDO Agrícola* 2005; 5 (1): 10-26.
17. Malavé-Acuña AC, Carrero-Molina PE. Desempeño funcional del boro en las plantas. *Revista UDO Agrícola* 2007; 7 (1): 1-14.
18. Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. Why boron? *Plant Physiol Biochem* 2004; 42 (11): 907-912.
19. Carrero P, Burguera JL, Burguera M, Rivas C. A time-based injector applied to the flow injection spectrophotometric determination of boron in plant materials and soils. *Talanta* 1993; 40 (12): 1967-1974.
20. Malavé A, Carrero P, Lemus M, García M. Contenido de boro en plantaciones de café (*Coffea arabica* L.) en dos localidades cafetaleras de Venezuela. *Idesia* 2009; 27 (1): 7-12.
21. Solís-Cúñez YM. Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible. [Trabajo especial de grado]. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Central del Ecuador. Quito. 2013; 125 pp.



22. Taípe-Echeverría DE. Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, zinc y potasio por espectrofotometría en muestras de agua en el centro de investigaciones y control ambiental (CICAM). [Trabajo especial de grado]. Escuela de Formación de Tecnólogos. Escuela Politécnica Nacional. Quito. 2014; 238 pp.
23. Sah RN, Brown PH. Boron Determination-A Review of Analytical Methods. *Microchemical journal* 1997; 56: 285-304.
24. Fernández Cellini R, Álvarez González F. Determinación Colorimétrica de Boro con Alizarinsulfonato Sódico. Junta de Energía Nuclear, Madrid, España. 1956; 22 pp.
25. Burguera M, Burguera JL, Rondón C, Carrero P. Determination of boron in blood, urine and bone by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium and citric acid as modifiers. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2001; 56 (10): 1845-1857.
26. Sánchez ER, Cabrera FM, Ale N. Determinación de boro total en fertilizantes por espectrometría de emisión atómica en flama. *Rev Per Quím Ing Quím.* 2003; 5 (2): 59-61.
27. Servant RE, Zaretsky A, Farías SS. Validación de un procedimiento para la determinación de boro, manganeso, molibdeno y vanadio mediante ICP-OES en aguas de zonas mineras a restituir. *Simposio de Metrología* 2010; 8 pp.
28. Muller CC, Thieli SN, Aline LHM, Valderi LD, Erico M MF, Muller, Edson IM. Determination of Boron in Silicon Carbide by ICP-OES and ICP-MS after Sample Preparation using Pyrohydrolysis. *J Braz Chem Soc* 2015; 26 (1): 110-116.
29. Loría LG, Jiménez R, Thellier M. Determinación de la concentración de boro natural en hojas de café, utilizando la técnica de autoradiografía por captura



**ACTA BIOCLINICA**

**Original**

**Vielma-Guevaray Col**

**Volumen 11, N° 21, Enero/Junio 2021**

**Depósito Legal: PPI201102ME3815**

**ISSN: 2244-8136**

---

neutrónica. Agronomía Costarricense  
1998; 22 (2): 211-216.