



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesis de Grado
para optar el título de
LICENCIADO EN QUÍMICA

**“UTILIZACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE
METALES BIODISPONIBLES EN SUELOS”**

AUTOR: REBOLLO, MARIA CELESTE
DIRECTOR: AZCARATE, SILVANA
CO-DIRECTOR: CAMIÑA, JOSÉ MANUEL

SANTA ROSA (LA PAMPA), ARGENTINA

2017

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección de la **Dra. AZCARATE, SILVANA** y bajo la co-dirección del **Dr. CAMIÑA, JOSÉ MANUEL**.

Rebollo, M. Celeste.

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento para la directora de esta tesis, Silvana Azcarate quien a través de su guía, me permitió explorar y aprender libremente en este tiempo, destacando siempre su calidad humana.

A mi co-director José Camiña, quien merece mi admiración y respeto por su tarea profesional, como así también por su ayuda indispensable para el análisis de los datos estadísticos de este trabajo.

Agradezco a aquellos con quienes compartí estos meses de indagación y producción de la presente tesina y aportaron desinteresadamente todo lo que estuvo a su alcance.

A toda mi familia, mi gran sostén, quienes me alientan día a día para cumplir mis objetivos.

Por último, a la Universidad Nacional de la Pampa, que me permitió cursar esta carrera de grado que estoy finalizando; por brindarme aprendizajes y conocimientos que serán el sostén en mi futuro profesional y por permitir encontrarme con personas maravillosas, tanto formadores como amigos que hicieron especial esta etapa de mi vida.

“Felices los que pueden dar sin recordar

y recibir sin olvidar”

Eternamente Gracias!

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron diferentes disolventes eutécticos profundos (DES -del inglés *Deep Eutectic Solvents*-) como una metodología alternativa a los métodos de extracción convencionales para determinar la composición elemental biodisponible en suelos mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MPAES).

Se sintetizaron seis DES con diferente composición y se evaluaron sus propiedades como solventes. El tratamiento propuesto consistió en una extracción utilizando los DES sobre las muestras de suelo con una posterior incubación en un baño termostatzado y seguido de un proceso de sonicación. A partir de las muestras del suelo analizado se realizó la cuantificación de 11 elementos disponibles (Ca, Ba, K, Sr, Cu, Mn, Ni, Mg, P, Fe y Na). Con el fin de evaluar la eficiencia de extracción de cada tratamiento se determinó también la concentración total de los mismos mediante una digestión ácida total del suelo empleando HNO₃ y HCl.

Las concentraciones elementales obtenidas a partir del tratamiento propuesto se compararon estadísticamente con las obtenidas mediante los tratamientos convencionales empleando AcNH₄ para la determinación de Ca, K, Mg y Na y HNO₃ diluido para la determinación del resto de los elementos.

Esta alternativa, presentó una aceptable extracción de elementos disponibles en suelo. De 11 elementos cuantificados, 9 no presentaron diferencias significativas respecto a los tratamientos convencionales. Además las eficiencias de extracción también fueron comparables. Los métodos convencionales presentaron algunas ventajas respecto a la precisión en comparación con los DES para ciertos elementos, sin embargo estos últimos presentan ventajas en cuanto al desarrollo de una química más limpia y sustentable.

SUMMARY

In the present work, different deep eutectic solvents (DES) were evaluated as an alternative methodology for conventional extraction methods in order to determine bioavailable elemental composition in soils by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry (MPAES).

Six DESs with different compositions were synthesized and then their properties as solvents were evaluated. The proposed treatment involves an extraction using the DES on soil samples, a subsequent incubation in a thermostatted bath and followed by a sonication process. From soil samples the quantification of 11 available elements (Ca, Ba, K, Sr, Cu, Mn, Ni, Mg, P, Fe and Na) was performed. In order to evaluate the extraction efficiency of each treatment, the total elemental concentrations of these same samples were determined by total acid digestion on soil using HNO_3 and HCl .

Elemental concentrations obtained from the proposed treatment were compared statistically with those obtained by conventional treatments using AcNH_4 for the determination of Ca, K, Mg and Na; and diluted HNO_3 for the determination of the other elements.

This alternative presented an acceptable extraction of elements available in soil. Nine of eleven quantified elements did not present significant differences respect to the conventional treatments. In addition, the extraction efficiencies were also comparable. For some elements, the conventional methods exhibited some advantages over precision when were compared with the proposed method. However, these last one showed advantages developing a cleaner and more sustainable chemistry.

INDICE

CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. COMPOSICIÓN DEL SUELO Y DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES.....	1
1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	2
1.2.1. Métodos convencionales.....	3
1.2.2. Una alternativa Verde.....	3
1.3. LÍQUIDOS IÓNICOS.....	4
1.3.1. Reseña histórica.....	4
1.3.2. Composición química.....	4
1.3.3. Propiedades físicas y químicas.....	5
1.3.4. Disolventes eutécticos profundos (DES).....	6
1.4. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS.....	8
1.4.1. Espectrometría de emisión atómica.....	8
1.4.2. Espectrometría de emisión atómica con plasma inducida por microondas (MPAES).....	9
1.5. HIPÓTESIS.....	11
1.6. OBJETIVOS.....	11
CAPÍTULO II	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. INSTRUMENTAL.....	12
2.2. MUESTRAS.....	12
2.3. MEDICIÓN DEL pH.....	12
2.4. CALIBRACIÓN.....	13
2.4.1. Elementos Minoritarios.....	13
2.4.2. Elementos Mayoritarios.....	13
2.5. SÍNTESIS DE DES.....	14
2.5.1. Des 1.....	14
2.5.2. Des 2.....	14
2.5.3. Des 3.....	15
2.5.4. Des 4.....	15
2.5.5. Des 5.....	15
2.5.6. Des 6.....	15
2.6. TRATAMIENTOS.....	15
2.6.1. Digestión ácida.....	15
2.6.2. Extracción con ácido nítrico diluido.....	16
2.6.3. Extracción con acetato de amonio.....	16
2.6.4. Extracción con Des.....	16
2.7. ANÁLISIS DE DATOS.....	16
CAPÍTULO III	
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DES SINTETIZADOS.....	17
3.2. OPTIMIZACIÓN INSTRUMENTAL.....	17
3.3. CALIBRACIÓN.....	19
3.4. DESEMPEÑO ANALÍTICO.....	20

3.5. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	22
3.5.1. Extracción disponible	23
3.5.1.1. Comparación entre los tratamientos convencionales y propuestos.....	26
3.5.1.2. Relación entre pH y disponibilidad.....	28
3.5.2. Digestión total.....	29
3.6. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO	
PROPUESTO.....	30
3.7. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL DES.....	32
CAPÍTULO IV	
4. CONCLUSIÓN	33
4.1. CONCLUSIÓN.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. COMPOSICIÓN DEL SUELO Y DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES

El suelo es un sistema polifásico que se encuentra en la capa más superficial de la corteza terrestre. Desde su formación a partir de la roca madre, el suelo sufre diversos procesos químicos y físicos que afectan de manera diferenciada el contenido de elementos químicos que lo constituyen (Zamora Rivas, 2006).

La composición del suelo se divide en tres fases: líquida (agua), gaseosa (aire) y sólida. La fase sólida está formada por dos tipos de compuestos: la materia orgánica y los compuestos inorgánicos. De manera general, un suelo agrícola contiene entre 15 – 25 % de agua, de 1 – 5 % de materia orgánica, un 45 % aproximadamente de minerales y el resto de aire (Figura 1) (Juma, 1998; Porta et al., 1999).



Figura 1. Representación esquemática de la composición porcentual de las tres fases del suelo: acuosa (agua), gaseosa (aire) y sólida.

La fracción inorgánica, en forma de arcillas, contiene minerales que aportan nutrientes a las plantas que son tomados a través del agua, ya que algunos son solubles en ella y así pueden ser transportados desde las raíces hacia el interior del vegetal. Sin embargo, sólo una pequeña parte de estos nutrientes presente en el suelo se encuentra disponible para las plantas (2 %), el resto (98 %) aparece en formas no asimilables, es decir, se hallan firmemente ligado a la fracción mineral y/o a la materia orgánica, resultando inaccesible mientras no se vea afectado por los procesos de descomposición. En este sentido, el perfil elemental biodisponible es aquel al que la planta puede acceder a través de las raíces para su crecimiento, quedando fuera de alcance otros componentes que constituyen parte estructural del suelo (Juma, 1998).

Las plantas requieren diferentes componentes orgánicos e inorgánicos para poder desarrollar sus actividades metabólicas y permitir su crecimiento. Dentro de las especies

inorgánicas, existen una serie de elementos considerados macronutrientes, los cuales son requeridos por la planta en cantidades mayores, tales como Na, K, Ca, Mg, P, S, etc. Por su parte, los micronutrientes son aquellos elementos que son requeridos en muy bajas concentraciones por el vegetal, pero que al igual que los macronutrientes, son indispensables para el normal funcionamiento metabólico de la planta. Dentro de los micronutrientes se pueden mencionar el Ni, Zn, Co, Cu, Si, Mn, Fe, etc, que forman parte de diversos biocomponentes de la planta, sin los cuáles no sobreviviría.

A fin de facilitar el entendimiento en relación al movimiento de iones en el suelo, es importante conceptualizar el término de capacidad de intercambio catiónico (CIC) ya que afecta el movimiento y retención de cationes en el suelo y consecuentemente, la nutrición vegetal y a la capacidad tampón del mismo (Jordán López, 2006). Se entiende por CIC a la medida de la cantidad de cargas negativas presentes en el suelo; esta propiedad, es la que define la cantidad de sitios disponibles para almacenar cationes en el suelo siendo los predominantes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ (Jaramillo, 2002). Éstos son considerados “cationes intercambiables” porque pueden ser reemplazados por otros cationes presentes en la solución del suelo. La CIC, por lo tanto, proporciona una reserva de nutrientes para reponer aquellos que fueron absorbidos por las plantas o lixiviados fuera de la zona de raíz. Por otra parte, la determinación del perfil elemental biodisponible para los vegetales en los suelos ha sido un tema de interés, pues define la calidad del mismo con fines de explotación agropecuaria (Ulloa Guitán et al., 2001).

1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Existen diferentes métodos analíticos que permiten tener una idea aproximada del perfil elemental biodisponible en suelos, que emplean diferentes soluciones extractantes y bajo diferentes condiciones de extracción (temperatura, pH, fuerza iónica, etc.). Los mismos han demostrado ser eficaces para dar una idea de la cantidad de nutrientes inorgánicos disponibles para el vegetal.

Los extractantes químicos son soluciones ácidas, básicas y/o sales que actúan facilitando la solubilidad de un nutriente contenido en el suelo, o bien, reemplazándolo (Alvarez, 2010). La solución extractora, debe extraer los nutrientes de las fracciones disponibles, tal como lo hacen las plantas. Los extractantes más utilizados son ácidos y bases diluidos que disuelven las formas más disponibles de los nutrientes (Lindsay et al., 1985).

1.2.1 *MÉTODOS CONVENCIONALES*

Algunos métodos convencionales de rutina que se utilizan para la extracción de cationes en suelo son:

- Digestión ácida: es el método tradicional utilizado en la preparación de varios tipos de muestras a fin de transferir por completo los analitos en solución para que puedan ser analizados en forma líquida mediante técnicas analíticas. En esencia el objetivo de todo proceso de digestión ácida es, por lo tanto, la descomposición total de la muestra evitando la pérdida y/o la contaminación de la sustancia de interés. Para esto se utilizan varios ácidos o mezcla de ellos, por ejemplo HNO₃:HCl (1:3) (d’Huicque et al., 2014; Guerrero, 2015).
- Extracción con ácido nítrico diluido: las soluciones concentradas de ácidos fuertes extraen nutrientes de la fase sólida no lábil y las soluciones diluidas extraen los elementos de la solución del suelo, de los lugares de intercambio y de aquellos que estén complejados o adsorbidos (Ulloa Guitán et al., 2001).
- Extracción con acetato de amonio: se determina a partir de la cantidad adsorbida de un catión índice, al hacer pasar una solución que contenga dicho catión a través de una muestra de suelo. Los métodos más utilizados, generalmente emplean como catión índice el NH₄⁺, K⁺, Na⁺ o Ba²⁺, utilizando soluciones tamponadas. El acetato de amonio es utilizado como el método de rutina prácticamente universal para determinar la CIC (Na, Ca, Mg, K) de los suelos (Rodríguez et al., 2002).

1.2.2 *UNA ALTERNATIVA VERDE*

Con el auge de la química “verde”, se han desarrollado disolventes “amigables” con el medio ambiente, y con propiedades capaces de reemplazar a los disolventes tradicionales. Los líquidos iónicos (LI) forman parte de esto disolventes “verdes” ofreciendo ventajas en procesos de extracción y preparación de muestras debido a sus propiedades únicas (Franco Vega et al., 2014).

1.3. LÍQUIDOS IÓNICOS

1.3.1 RESEÑA HISTÓRICA

El término “líquido iónico” fue expuesto por primera vez por un famoso investigador y profesor de química nacido en Latvia y nacionalizado Alemán, Paul Walden, quien en el año 1914 sintetizó el nitrato de etilamonio.

Los primeros LI sintetizados fueron utilizados como electrolitos, aunque debido a la amplia gama de propiedades que ofrecen, estos compuestos han ido adquiriendo importancia y un particular interés para la sustitución de los solventes orgánicos volátiles, contribuyendo así al desarrollo de una química más limpia y sustentable (Liu et al., 2009).

1.3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los LI son un grupo de sales orgánicas con un intervalo de punto de fusión por debajo del punto de ebullición del agua, y cercano a la temperatura ambiente. Normalmente, los LI están formados por cationes orgánicos que se encuentran unidos con un anión orgánico o inorgánico (Jiao et al., 2013; Franco-Vega et al., 2014).

Las diferentes combinaciones de tales cationes y aniones pueden generar un gran número de LI. Hasta el momento, se han sintetizado más de 500 tipos. El catión del LI es el principal responsable del comportamiento químico, mientras que el anión contribuye con la mayor parte de las propiedades físicas. El catión usualmente es de gran tamaño con respecto al anión, por lo que las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales, sales fundidas, determinando que estos compuestos sean líquidos a temperatura ambiente.

De otro modo, en las sales convencionales, como es el caso del NaCl, cuando se van enlazando los iones Cl^- con los iones Na^+ , se produce un elevado empaquetamiento entre ellos para formar una estructura cristalina. Sin embargo, en los LI, al originarse de dos iones poco uniformes y uno de ellos, el catión orgánico muy asimétrico, no puede lograrse un empaquetamiento que facilite un arreglo cristalino. Basta un pequeño aporte de energía para separar los aniones y los cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido. Este pequeño aporte se logra cuando se expone a temperaturas próximas a las del ambiente (Rogers et al., 2003).

1.3.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Los LI hoy en día son de gran interés debido a que cuentan con propiedades físicas y químicas únicas, que les han dado ventajas significativas sobre otros disolventes en diferentes aplicaciones (Singh et al., 2008).

- Presión de vapor: la débil interacción coulombica que presentan los LI entre sus iones limita la formación de pares iónicos, necesarios para que se produzca la volatilización de las sales, por lo que estas sustancias tienen presión de vapor muy baja o indetectable. Esta característica los hace fácilmente manipulables al no evaporarse.
- Densidad: se ha medido esta propiedad física para la mayor parte de los líquidos iónicos y en general, todos tienen mayor densidad que el agua.
- Viscosidad: es una propiedad que afecta a la difusión de los solutos y a los parámetros prácticos, como la agitación de mezclas y bombeo de fluidos. Los LI son, por su propia naturaleza iónica, mucho más viscosos que los solventes orgánicos convencionales. La viscosidad en los LI presenta una fuerte correspondencia con la temperatura y es afectada por la presencia de impurezas (Seddon, 1997). Los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. Así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones del tipo Van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno.
- Punto de fusión: condiciona el límite inferior del intervalo de temperatura en el que puede utilizarse el LI como solvente. Los LI tienen un bajo punto de fusión, normalmente por debajo de la temperatura ambiente. El punto de fusión depende principalmente del tamaño del LI, de su carga y de la distribución de la misma. Así, el punto de fusión disminuye al aumentar el tamaño del anión y del catión. Asimismo, un incremento en la simetría de los iones supone un aumento del punto de fusión, ya que permite un mayor empaquetamiento de los mismos.
- Solubilidad: debido a su naturaleza iónica y a su composición orgánica, los LI son capaces de disolver compuestos orgánicos, inorgánicos e incluso materiales poliméricos (Koel, 2000; Aki et al., 2001; Carmichael et al., 2000).
- Hidrofilicidad/hidrofobicidad: la miscibilidad de los LI en agua es una propiedad particularmente interesante. Todos los LI descritos hasta la fecha son higroscópicos.

Mientras algunos son miscibles con agua en todas las proporciones, otros se saturan en agua formando sistemas bifásicos. La solubilidad de los LI depende en gran medida de la naturaleza del anión debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre el anión y las moléculas de agua.

- Estabilidad térmica: la descomposición térmica define el límite superior del intervalo de temperatura en el que el LI puede utilizarse. El intervalo de temperaturas en que los LI se encuentran en estado líquido es mayor al de los solventes moleculares convencionales. Su temperatura de descomposición se encuentra normalmente entre 350 y 400 °C. La naturaleza del catión y del anión que conforman el LI condiciona su temperatura de descomposición.
- Estabilidad química: algunos LI son compuestos no inflamables y químicamente inertes, mientras que otros que son muy sensibles a la humedad y, por lo tanto, necesitan ser cuidadosamente protegidos de ella (Gordon, 2001).
- Toxicidad: aunque aún no se dispone de datos para muchos LI, la volatilidad prácticamente nula de los mismos reduce las potenciales vías de exposición, siendo el contacto directo con la piel y la ingestión prácticamente las únicas vías posibles. Algunos de ellos pueden ser tóxicos, mientras otros pueden ser relativamente inofensivos y biodegradables. En general, la mayoría de los LI investigados presentan una toxicidad menor, a la observada para solventes orgánicos convencionales (Docherty et al., 2005; Freemantle, 2010).
- Peligrosidad: algunos LI son reactivos y corrosivos, pero la gran mayoría son mucho más seguros que los solventes orgánicos. Su naturaleza no inflamable debido a su baja presión de vapor hace que disminuya considerablemente el riesgo a incendios (Romero Salvador, 2008).

1.3.4 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

Los DES (del inglés *Deep Eutectic Solvents*), son una nueva clase de solventes análogos de los LI, que también pueden tener un carácter iónico pero que consisten en una mezcla de compuestos orgánicos que tienen un punto de fusión significativamente menor que el de cada componente individual.

Los DES comparten muchas propiedades físicas con los LI y se obtienen por complejación entre un aceptor de hidrógeno y un donador de enlace hidrógeno. La deslocalización de carga que ocurre, es responsable de la disminución del punto de fusión de la mezcla con respecto a los puntos de fusión de los compuestos que lo forman. Los DES más comunes se basan en cloruro de colina, ácidos carboxílicos y otros donantes de enlaces hidrógenos, por ejemplo, urea, ácido cítrico, ácido succínico y glicerol. En la Figura 2 se pueden observar las estructuras de dos de ellos.

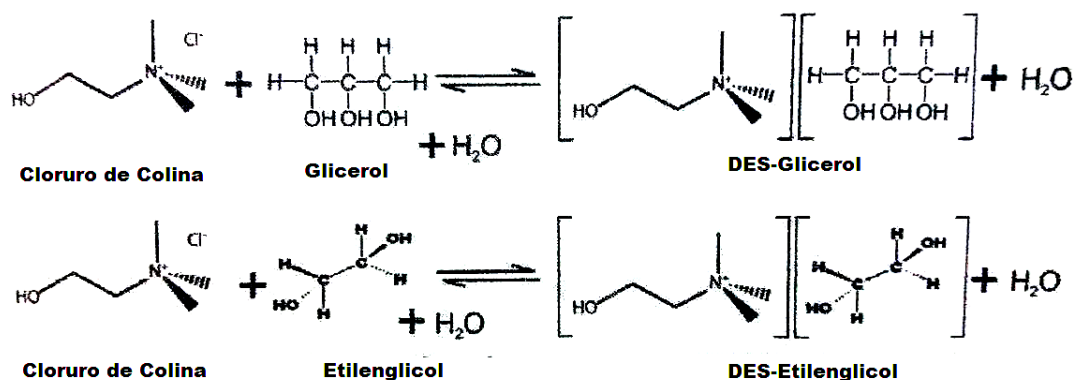


Figura 2. Ejemplos de diferentes estructuras de DES.

Los DES tienen características similares a LI, pero son más baratos de producir, menos tóxicos y biodegradables (Paiva et al., 2014). Han atraído la atención en diversos campos: síntesis química, reacción catalítico-metálica, catálisis biológica, lubricación, procesos electroquímicos, producción y purificación de biodiesel, separación de alifáticos y aromáticos (Mukhopadhyay et al., 2016).

Como una de las tantas aplicaciones, se ha utilizado el DES cloruro de colina:ácido oxálico como solvente para la extracción y posterior determinación de metales en muestras de suelo agrícola mediante ICP - OES (Matong et al., 2017). Además, DES basados en amonio se han aplicado como novedosos agentes de lavado del suelo para la eliminación de plomo (Mukhopadhyay et al., 2016).

Como el número de posibles DES es elevado, es factible diseñarlos de manera que reúnan las propiedades más adecuadas para una óptima aplicación particular que se pretenda efectuar.

1.4. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

Los métodos espectrométricos son un gran grupo de métodos analíticos que se basan en la espectroscopia atómica y molecular. La espectroscopia es un término general para la ciencia que trata con las interacciones de varios tipos de radiación con la materia. La espectrometría y los métodos espectrométricos se refieren a la medición de la intensidad de la radiación con un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico.

Diferentes tipos de métodos espectrométricos se pueden usar para identificar los elementos presentes en muestras de materia y determinar sus concentraciones: la espectrometría de absorción atómica, la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente, la espectrometría de rayos X y la fluorescencia atómica en menor medida.

En la espectroscopia atómica, los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos gaseosos o iones elementales mediante un proceso llamado atomización. Se mide entonces la absorción de la radiación ultravioleta-visible, la emisión o la fluorescencia de las especies atómicas presentes en la muestra (Skoog et al., 2008). Estos fenómenos están asociados con cambios en los estados de energía de las diferentes especies. Por consiguiente, dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectroscopia puede utilizarse para identificar y cuantificar la composición elemental de la muestra a analizar (Harris, 2003).

1.4.1 ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA

La Espectroscopia de Emisión Atómica (AES) se basa en la emisión de energía que genera una especie atómica excitada. Cuando un átomo que se encuentra en el estado de menor energía, denominado estado fundamental, puede captar energía calórica de un atomizador -plasma o llama-, suministrando energía suficiente para promover uno de los electrones, ubicado en un orbital externo, a un estado electrónico de mayor energía, estado excitado. Este electrón, al retornar al estado fundamental, emite el exceso de energía bajo la forma de fotón –o radiación característica-. La energía del fotón será igual a la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado: este proceso es conocido como transición electrónica (Figura 3) (Butcher, 1998).

Los espectros atómicos están caracterizados por su relativa simplicidad, ya que típicamente consisten en líneas estrechas, las cuales corresponden a un número limitado

de posibles niveles de energía. Cada elemento posee una única configuración de niveles de energía, y consecuentemente, un único espectro.

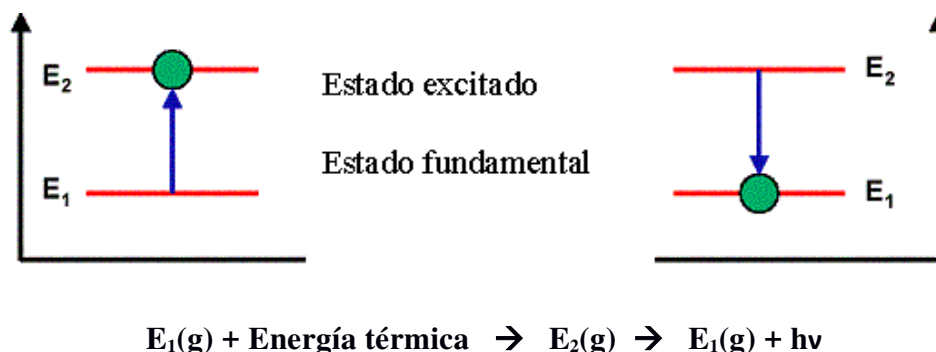


Figura 3. Fundamento de la emisión atómica. E_1 y E_2 representan al átomo en estado fundamental y excitado, respectivamente.

1.4.2 ESPECTROMETRIA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA INDUCIDO POR MICROONDAS (MPAES)

Mediante MPAES es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles trazas partiendo de muestras en disolución acuosa.

En el proceso de emisión en el MPAES, la muestra es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es convertida en aerosol por la acción del gas nitrógeno, por efecto Venturi (Harris, 2003). El aerosol se introduce entonces en el centro del plasma caliente, donde se desolvata, se descompone y luego se atomiza.

El plasma es generado al someter un flujo de gas nitrógeno y pequeñas cantidades de argón, introducidos tangencialmente a través de la antorcha, a una radiación microondas que genera un campo magnético oscilante. Una chispa produce algunos electrones libres en el argón, que son acelerados en el campo magnético, causando una mayor ionización y formación del plasma, haciendo que el plasma se autosostenga sólo con nitrógeno una vez que es generado. La muestra es convertida en átomos al estado gaseoso que son excitados por consecuencia de las altas temperaturas que alcanza el plasma. Cada átomo procedente de la muestra es excitado por el plasma vuelve al estado fundamental, emitiendo radiaciones a una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de

las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra. La información es procesada por el sistema informático (Figura 4).

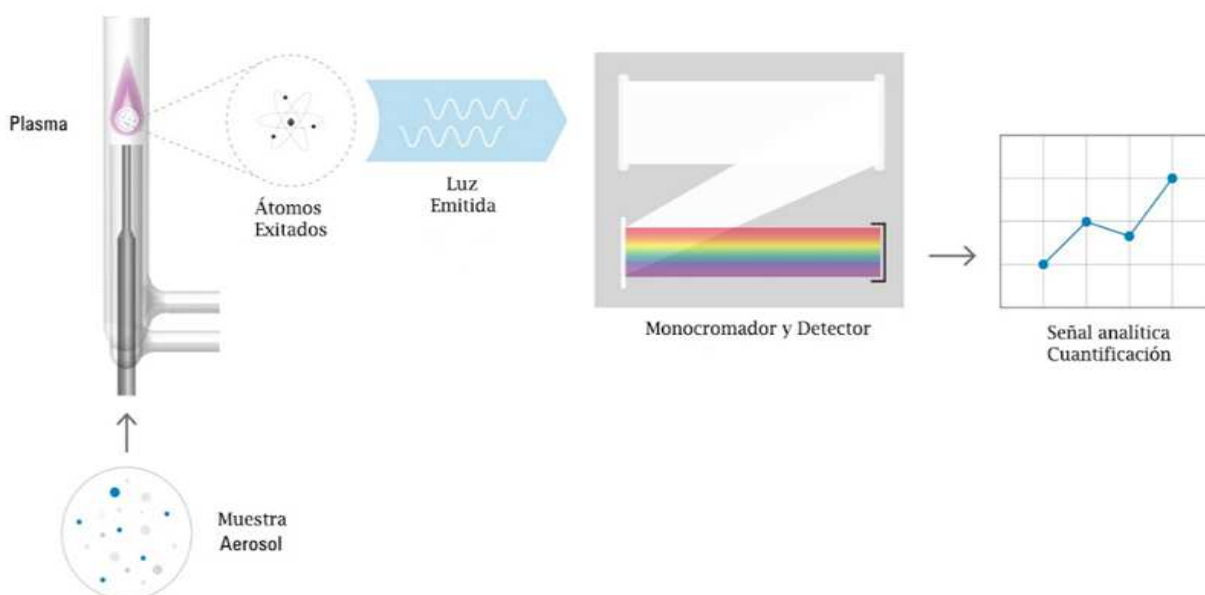


Figura 4. Diagrama del proceso de emisión y detección en un espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas.

La espectrometría de emisión atómica se ha convertido en los últimos años en la metodología analítica de mayor interés, debido a su poder de detección, precisión, sensibilidad, velocidad, y capacidad de análisis multielemental. Además se puede resaltar los bajos costos de operación, ya que el MPAES posee un generador de nitrógeno, que utiliza el aire atmosférico para proporcionar un suministro de nitrógeno continuo que permite el funcionamiento del plasma (Agilent, 2016).

1.5. HIPÓTESIS

Los DES son tan efectivos para extraer los metales biodisponibles en los suelos como los reactivos utilizados en los métodos de extracción convencionales.

1.6. OBJETIVO

Evaluar diferentes DES como una metodología alternativa a los métodos de extracción convencionales para determinar la composición elemental biodisponible en suelos mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MPAES).

CAPÍTULO II

MATERIALES

Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INSTRUMENTAL

Las mediciones se realizaron con un Espectrómetro de Emisión Atómica marca Agilent, modelo MP 4100, equipado con un nebulizador One Neb y una cámara ciclónica de doble paso. Se establecieron los parámetros instrumentales del MPAES (Tabla 1) y se optimizó la posición de visualización, y la presión de nebulización para cada uno de los elementos y tratamientos estudiados.

Tabla 1. Parámetros instrumentales del MPAES

Nº de réplicas	3
Velocidad de bombeo	15 rpm
Introducción de la muestra	Manual
Tiempo de toma de muestra	5 segundos
Tiempo de estabilización	10 segundos

2.2. MUESTRAS

La muestra de suelo agrícola estudiada en el presente trabajo fue tomada del campo experimental EEA-INTA-Anguil perteneciente al departamento Capital, provincia de La Pampa. Una vez recolectada la muestra, se colocó en bandejas y se secó a temperatura ambiente. Luego se tamizó por una malla de 2 mm y se almacenó en frascos de material plástico (Matong et al., 2017). Antes de cada análisis la muestra fue secada en estufa. Para la manipulación, almacenamiento y tratamiento de las muestras, se empleó material de plástico para prevenir la contaminación por metales. El material de plástico que se utilizó, se lavó previamente con una solución de ácido nítrico al 5 % (v / v), y posteriormente se lavó con agua Milli-Q tres veces.

Todo el agua utilizada fue obtenida mediante un ultrapurificador de agua Millipore® modelo ultrapure System (Mili-Q), con resistividad de 18,2 MΩ cm, a 25° C.

2.3. MEDICIÓN DEL pH

Específicamente para suelos se pueden evaluar distintos tipo de acidez de acuerdo al objetivo deseado: pH actual, pH potencial y pH hidrolítico (Vázquez, 2005). El pH actual es aquel que considera los H⁺ presentes en la solución del suelo y se considera un reflejo de lo que encontraría una planta en su ambiente radicular. En este contexto, se realizó la

determinación del pH actual sobre el suelo en estudio, para ello se preparó una relación 1:2,5 (suelo:solución), empleando agua ultrapura como solución extractora y realizando la medida luego de 2 horas de reposo de la suspensión (SAMPLA, 2004). Se utilizó un pHmetro HORIBA modelo F-23 con su correspondiente electrodo.

2.4. CALIBRACIÓN

Con el objetivo de minimizar los efectos de matriz y mejorar la exactitud de las muestras con los diferentes DES, se llevó a cabo como estrategia de calibración la simulación de la matriz preparando los conjuntos de calibración de la misma manera en que se preparó cada tratamiento. Se prepararon tres conjuntos de calibración (uno para elementos minoritarios y dos para elementos mayoritarios) de cinco niveles de concentración cada uno por triplicado.

2.4.1 ELEMENTOS MINORITARIOS

Se utilizó una solución estándar multielemental Agilent Technologies para ICP - OES & MPAES. Matriz 5 % ácido nítrico y 2% ácido fluorhídrico que contiene 50 mg L⁻¹ de: Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr y Zn. Se realizaron las rectas de calibración de los elementos minoritarios abarcando un intervalo de 10-1000 ppb. Se preparó una solución de blancos de reactivos para cada recta.

2.4.2 ELEMENTOS MAYORITARIOS

Se utilizó una solución estándar multielemental SCP SCIENCE Plasma CAL de 1000 mg L⁻¹ para Na, Ca, y Mg. A partir de estos estándares se construyó una recta de calibrado para los elementos mayoritarios, del mismo modo que para los elementos minoritarios, donde se eligió un rango de concentraciones desde 10-400 ppb. Se evaluaron soluciones blanco para cada elemento.

Por otro lado se utilizaron estándares monoelementales SCP SCIENCE Plasma CAL de 1000 mg L⁻¹ para Fe, P y K, se construyó una recta de calibrado procediendo de igual manera y se eligió un rango de concentración de 5-60 ppm. Se evaluaron soluciones blanco para cada elemento.

2.5. SÍNTESIS DE LOS DES

Se sintetizaron seis DES combinando diferentes reactivos. Para obtener cada DES un vaso de precipitado conteniendo los reactivos sólidos se colocó en un baño termostatzado a 80 °C y se mezclaron utilizando un agitador eléctrico a paleta, a 40 rpm por 30 minutos (Matong et al., 2017; Habibi et al., 2013). Los DES obtenidos y los correspondientes reactivos a partir de los cuales se formaron se muestran en la Tabla 2. En todos los casos, se preparó un volumen de 50 mL de DES aproximadamente, después de su preparación se almacenaron en recipientes de plástico cerrado herméticamente.

Tabla 2. DES sintetizados.

DES	Reactivos	Relación
DES 1	Citrato de Colina: Etilenglicol	1:4
DES 2	Citrato de Colina: Agua	1:5
DES 3	Citrato de Colina: Glicerol	1:4
DES 4	Cloruro de Colina: Urea	1:2
DES 5	Cloruro de Colina: Oxálico	1:2
DES 6	Cloruro de Colina: Urea	1:4

2.5.1 DES 1

Se pesó en balanza analítica digital OHAUS 39,78 g de citrato de colina Parafarm al 99,3% de pureza, previamente secado en estufa a 60 °C y se añadió 30 mL de etilenglicol Fluka A.G puro. Se introdujo el vaso precipitado con la mezcla en un baño de agua y se agitó por 30 minutos.

2.5.2 DES 2

Se pesó en balanza analítica digital 35 g de citrato de colina Parafarm al 99,3% de pureza, previamente secado en estufa a 60 °C y se le añadió 10,67 mL agua Mili Q. Se mezcló y se introdujo en el baño termostatzado, en este caso no fue necesaria la agitación.

2.5.3 DES 3

Se realizó el mismo procedimiento que para el DES 1. Se utilizó 40,4 g de citrato de colina Parafarm al 99,3% de pureza y 40 mL de glicerol Biopack puro.

2.5.4 DES 4

Se pesó 37,64 g de cloruro de colina Sigma al 98% de pureza y 32,35 g de urea Alcor puro y se procedió de igual manera que para los DES anteriores.

2.5.5 DES 5

Se pesó 21,85 g de cloruro de colina Sigma Aldrich al 98 % de pureza y 27 g de ácido oxálico Merck puro y se procedió de igual manera.

2.5.6 DES 6

Se procedió de igual manera que el DES 4 cambiando la relación a 1:4. Pesando 18,82 g de cloruro de colina y 32,04 g de urea.

2.6. TRATAMIENTOS

La mayoría de los métodos separativos y determinativos utilizados en el análisis químico, se llevan a cabo en medio acuoso, por lo que las sustancias sólidas se deben disolver convenientemente para poner en solución los analitos de interés (Boumans, 1987; Herber et al., 1994). Debido a que los elementos que están presentes en el suelo se encuentran en diferentes concentraciones es posible que, dependiendo del analito que se quiera determinar, sea necesaria la dilución de la muestra. Sin embargo, y a fin de evitar el aumento de número de etapas y de posibles errores, se prefirió utilizar diferentes pesos de muestra.

2.6.1 DIGESTIÓN ÁCIDA

Se pesaron 0,01 g, 0,05 g y 0,5 g de suelo previamente secados a estufa, se añadió 1 mL de HNO₃ y 3 mL de HCl ultra puros, libres de metales, purificados a través de un sistema de destilación de ácidos sub-boiling marca Berghoff®. Posteriormente se llevó a baño de agua a 90 °C por 1 hora y luego se sonicó en baño ultrasónico Teslab durante otra hora. Por último se enrasó a un volumen final de 10 mL con agua mili-Q (Matong et al., 2017).

2.6.2 EXTRACCIÓN CON ÁCIDO NÍTRICO DILUÍDO

Se pesaron 0,01 g, 0,05 g y 0,5 g de suelo, se adicionaron 10 mL de HNO₃ 1M, se agitó y se sonicó por 10 minutos en el baño ultrasónico. La solución se enrasó a un volumen final de 10 mL.

2.6.3 EXTRACCIÓN CON ACETATO DE AMONIO

Se pesaron las mismas cantidades de muestra que los demás tratamientos, se añadió 2 mL de acetato de amonio 1M (pH 7) se agitó y sonicó por 5 min. A continuación, se equilibraron los pesos de los tubos y se llevó a centrifuga durante 5 min. Se filtró con papel Whatman N° 1; al líquido sobrenadante y sobre el suelo remanente se repitió el procedimiento por 2 veces más. Por último se llevó a 10 mL de volumen final con acetato de amonio 1 M.

2.6.4 EXTRACCIÓN CON DES

En este caso se trabajó con dos pesos de suelo, 0,01 g. y 0,5 g, dependiendo los analitos a determinar. Se adicionó 2,5 mL de los DES obtenidos y se llevó a baño de agua a 90 °C por 30 min. Posteriormente se sonicó por otros 30 min y se enrasó a volumen final de 5 mL con HNO₃ 1M. Por último se centrifugó por 10 minutos y se separó el líquido sobrenadante del suelo decantado.

2.7. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los cálculos referidos a las calibraciones, cifras de mérito y comparaciones, y los correspondientes test estadísticos se realizaron a través de la interface gráfica de MATLAB versión R2014b (The Mathworks Inc., Natick, Mass., U.S.A.). Previo a cada calibración se evaluó homogeneidad y heterogeneidad de los datos. Las calibraciones se realizaron por ajustes de las rectas con el criterio de mínimos cuadrados y se evaluó el intervalo de linealidad de las mismas a través de un *test* F. Se evaluaron diferencias significativas entre los tratamientos a través de la comparación de medias mediante una prueba *t* empleando Microsoft Office Excel 2007. Todos los *test* se evaluaron al 95 % de nivel de confianza.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DES SINTETIZADOS

Como primer paso se procedió a la síntesis de los primeros cinco DES. Se obtuvieron soluciones de diferentes viscosidades y transparencias (Figura 5). La viscosidad de los DES es una de las propiedades que se destaca en estas soluciones extractantes y se pudo observar que son líquidos ligeramente densos que fluyen con facilidad y son todos solubles en agua.



Figura 5: DES sintetizados. 1- citrato de colina:etilenglicol (1:4). 2-citrato de colina:agua (1:5). 3- citrato de colina:glicerol (1:4). 4- cloruro de colina:urea (1:2). 5- cloruro de colina:oxálico (1:2).

Con la finalidad de evaluar el poder extractante de los diferentes DES, se evaluó en primera instancia el comportamiento de los mismos en contacto con el suelo y al posterior proceso de extracción. Todos los DES conservaron su consistencia cuando se agregaron a las muestras de suelo y luego de ser sometidos a todos los pasos necesarios para la extracción, a excepción del DES 5 que adquirió una mayor viscosidad. El sistema de nebulización del MPAES requiere que las muestras sean líquidas para que puedan fluir a través del sistema de inyección y posteriormente ser nebulizadas (Harris, 2003). Debido a que el DES 5 no cumplió esta condición, fue desestimado para los estudios posteriores.

3.2. OPTIMIZACIÓN INSTRUMENTAL

Previo a realizar las mediciones, se optimizaron las fluctuaciones de la presión de nebulización y de la posición de visualización para evaluar el efecto de ambas variables sobre la intensidad analítica de cada elemento para cada DES. Para ello, se mantuvieron

constantes el tiempo de toma de muestra, lavado y estabilización del plasma, y la velocidad de bombeo a la que ingresa la muestra, indicadas en la Tabla 1, de la sección 2.1. y se realizaron múltiples mediciones de la intensidad de la señal de los analitos respecto a la fluctuación de cada una de estas variables de manera individual.

A modo de ejemplo se representa, en la Figura 6 (a), la proporción de la señal analítica y la señal del ruido que la corrompe -relación señal/ruido- en función del aumento de la presión del gas en el nebulizador para la optimización del DES3. Se muestra en la Figura 6 (b), también para el mismo DES, la posición de visualización del plasma para cada longitud de onda seleccionada de los elementos estudiados. Los valores de la presión del nebulizador y la posición de visualización (Tabla 3) se obtuvieron a partir de la observación de la máxima intensidad de la señal para cada analito.

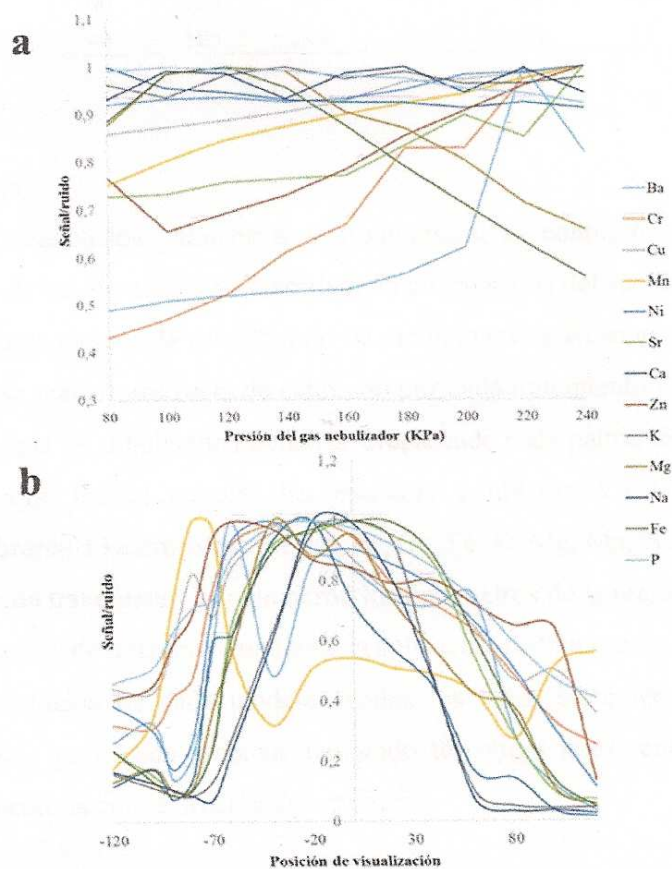


Figura 6. Optimización instrumental (a) Cambios en la relación Señal/Ruido en función de la presión del gas del nebulizador (b) Señal/ruido en función de la posición de visualización de la antorcha del MPAES.

Tabla 3. Valores de la presión del nebulizador y la posición de visualización obtenidos a partir de la optimización instrumental para cada analito y para cada DES.

Analito	Presión del nebulizador [kPa]				Posición de visualización			
	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4
Ba	200	220	220	220	0	10	-40	0
Ca	240	220	240	200	10	10	10	10
Cr	220	240	240	240	-10	0	-10	-10
Cu	140	160	240	160	-10	0	0	0
Fe	120	140	140	120	20	20	20	10
K	240	240	240	200	10	10	10	10
Mg	240	200	240	220	0	10	-10	0
Mn	120	240	80	240	-80	-10	-80	0
Na	240	240	240	240	10	10	0	10
Ni	80	80	140	80	-20	-10	-20	-10
P	120	100	140	140	-20	-10	20	-10
Sr	100	200	120	180	10	10	20	0
Zn	240	140	180	240	-30	-20	-30	-20

3.3. CALIBRACIÓN

Una vez optimizados los parámetros instrumentales, se continuó con la etapa de calibración analítica de los elementos a determinar en las muestras del suelo agrícola.

Con el objetivo de mejorar la exactitud de las mediciones de las muestras tratadas con los diferentes DES, se realizó una recta de calibrado por cada tratamiento (Sección 2.4). Se implementó la estrategia de simulación de matriz, preparando cada patrón de calibrado de la misma manera en que fueron tratadas las muestras y utilizando estándares acuosos inorgánicos. Se calibraron 13 elementos: Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Sr y Zn. Por cada analito y cada tratamiento se obtuvieron los parámetros de la regresión (Tabla 4) y se llevó a cabo un estudio de linealidad mediante la aplicación de una prueba F ($F_{\text{tabla}} = 2.892$) para evaluar la adecuación de cada modelo. Todos los datos cumplieron la prueba de linealidad presentando para cada recta de calibrado un rango lineal entre su límite de cuantificación y la máxima concentración determinada.

Tabla 4. Pendiente de las rectas de los analitos, utilizando calibración con estándares acuosos, simulando la matriz de los tratamientos DES1, DES2, DES3 y DES 4, en la determinación multielemental por MPAES

	Pendiente			
	DES1	DES2	DES3	DES4
Ba	60 (1)	86 (1)	9.4 (0.5)	49.5 (0.5)
Ca	1944(34)	2116 (30)	1841 (46)	2570 (53)
Cr	14.3 (0.3)	28.8 (0.1)	22 (1)	21.8 (0.1)
Cu	69 (1)	113.6 (0.6)	75 (1)	13.5 (0.5)
Fe	3369 (34)	3618 (93)	3488 (126)	3319 (24)
K	34740(1474)	35890 (1757)	36017 (544)	38787 (1771)
Mg	1881 (83)	2073(22)	1802 (44)	2427 (22)
Mn	2.40 (0.02)	31.4 (0.1)	1.8 (0.1)	3.88 (0.01)
Na	4006(142)	4789 (59)	4287 (91)	4874 (145)
Ni	9.81 (0.20)	10.67 (0.02)	9.1 (0.7)	9.69 (0.04)
P	186 (3)	204 (3)	185(5)	203 (2)
Sr	80(2)	106 (2)	61 (2)	84 (1)
Zn	0.35 (0.01)	8.9 (0.1)	0.11 (0.01)	0.23 (0.01)

Valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

3.4. DESEMPEÑO ANALÍTICO

Las cifras de mérito de un método analítico se utilizan regularmente con el propósito de calificar un determinado método y comparar sus propiedades analíticas con otros (Olivieri, 2014; Currie, 1995). Con la finalidad de evaluar los diferentes DES se determinaron: sensibilidad de la calibración, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) (Tabla 5).

La sensibilidad de la calibración (SEN) es igual a la pendiente de la recta de calibrado e indica la variación de respuesta producida por una unidad de variación de concentración del analito, y sus unidades son de señal \times concentración⁻¹. La sensibilidad de los analitos entre las calibraciones planteadas puede evaluarse comparando las pendientes de las curvas de calibración (Goncalves, 1998). En la Tabla 4, en función de los órdenes de magnitud, se puede observar de manera general que existen diferencias entre las sensibilidades de los elementos, pero no se aprecian diferencias evidentes entre los diferentes DES comparándolas para un mismo elemento en la mayoría de los casos.

Los elementos de intercambio (Ca, K, Mg y Na) poseen las pendientes con valores mayores respecto al resto de los elementos, lo que indica una mayor sensibilidad de estos analitos. Por otro lado se puede observar que para estos mismos analitos, el DES 4 es el que

presenta mayor pendiente, por lo tanto es el tratamiento más sensible para la determinación de los elementos determinantes de la CIC. Si se comparan las pendientes del resto de los elementos, podemos observar que en todos los casos las mayores sensibilidades se observan para el DES 2. A su vez para P, la diferencia del DES 2 respecto al DES 4 es mínima.

El LOD es la mínima concentración detectable de manera confiable por el método que sea propuesto. En la definición moderna, el LOD se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco (s_0) (Olivieri, 2014; Clayton et al., 1987). El s_0 se puede calcular mediante la siguiente ecuación, considerando que las muestras se analizaron por triplicado ($n = 3$) y en la que el analito no está presente en las muestras blancos.

$$s_0 = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

donde, $s_{y/x}$ es el desvío estándar de los residuos de la regresión,

es la concentración media de calibrado, A es la pendiente de la recta de regresión, m

\bar{x}

es el número total de patrones de calibrado, y Q_{xx} es la suma de cuadrados de la x .

El LOD se calculó en base a esta definición que ha sido adoptada por IUPAC (Currie, 1995) e ISO (Wilrich, 1997) donde $LOD = 3,3 s_0$. El límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco: $LOQ = 10 s_0$.

Los valores de los LOD y LOQ alcanzados (Tabla 5) calculados a partir de las rectas de calibración, son comparables a los obtenidos para los tratamientos convencionales y en muchos de los casos se consiguieron cifras aun menores, lo que indica una mejora en las cifras de mérito.

Tabla 5. Cifras de mérito de los analitos estudiados para los tratamientos convencionales y para cada tratamiento propuesto.

Analitos	LOD ($\times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$)					LOQ ($\times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$)				
	Convencional	Propuesto				Convencional	Propuesto			
	HNO ₃ /AcNH ₄ *	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4	HNO ₃ /AcNH ₄ *	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4
Ba	1	3	4	4	1	3	8	10	11	2
Ca	3	6	3	2	1	10	18	8	6	0
Cr	4	11	4	9	27	13	33	11	28	83
Cu	405	26	965	1	110	1337	80	2926	4	333
Fe	33	44	80	201	107	109	131	243	604	325
K	328	566	716	292	127	1082	1697	2170	877	384
Mg	1	3	2	5	1	3	8	5	14	2
Mn	29	19	6	36	18	96	58	17	109	54
Na	3	5	3	3	24	10	15	10	8	74
Ni	12	1	11	12	26	40	3	35	35	79
P	2322	900	1077	643	856	7663	2700	3264	1929	2593
Sr	1	1	1	1	3	3	2	2	2	10
Zn	127	183	47	149	112	419	557	143	447	340

*Tratamiento convencional. AcNH₄ empleado para la determinación de Ca, K, Mg y Na. HNO₃ diluido empleado para la determinación del resto de los elementos.

Se puede observar en la Tabla 5 que las mejores cifras de mérito entre los diferentes tratamientos se obtuvieron a partir del DES 4, cuyos valores de LOD y LOQ son en general, menores al de las soluciones extractante de HNO₃ diluido y AcNH₄.

3.5. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Debido a la complejidad de las reacciones químicas y de los procesos que determinan el aumento o la pérdida de nutrientes en el suelo, es difícil predecir el comportamiento de los mismos. Como primera aproximación, y en base a la extracción con reactivos más o menos selectivos y específicos para una forma o asociación físico-química particular, se admite que los nutrientes del suelo se pueden encontrar en cinco fracciones o estados: soluble, intercambiable, asociados a la materia orgánica, asociados a óxidos, asociados a minerales primarios y secundarios (Alloway, 1995). También se admite que la fracción más lábil, en la que se encuentra la porción de un elemento asimilable a corto y medio plazo está formada por los tres primeros estados: soluble, intercambiable y asociada a la materia orgánica. Por tanto, el contenido total de un nutriente en un suelo no necesariamente es indicativo de la cantidad que está disponible para la planta.

En la práctica, existe una gran diversidad de soluciones extractantes que permiten determinar distintas fracciones de nutrientes, pero no existe ninguna que sea satisfactoria para todos los tipos de suelo (Lebourg et al., 1996). Entre ellos hay que citar: i) soluciones salinas -usadas principalmente para macronutrientes intercambiables-; ii) soluciones quelantes - los agentes quelantes se combinan con los iones en solución formando complejos solubles-; iii) soluciones ácidas -las soluciones concentradas de ácidos fuertes extraen nutrientes de la fase sólida no lábil y las soluciones diluidas extraen los elementos de la solución del suelo, de los lugares de intercambio y de aquellos que estén complejados o adsorbidos-.

Una vez realizadas las diferentes extracciones y obtenidas las mediciones por triplicado para cada elemento y tratamiento, se calcularon las concentraciones promedios, sus correspondientes desvíos estándar y los intervalos de confianza (IC). En la Tabla 6 se muestran las concentraciones promedios expresadas en $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{IC}$ de los elementos obtenidos por los diferentes tratamientos. En dicha Tabla, Cr y Zn no son informados debido a que se encontraron por debajo del LOD. Posteriormente, las concentraciones alcanzadas con los tratamientos propuestos se compararon con las concentraciones obtenidas a partir de los tratamientos convencionales a través de una prueba t de comparación de medias.

3.5.1. EXTRACCIÓN DISPONIBLE

Una solución extractante, debe extraer los nutrientes de las fracciones disponibles, tal como lo hacen las plantas. Aunque no es necesario que la técnica de análisis extraiga exactamente la misma cantidad de nutriente que la planta, el valor extraído debe correlacionar bien con la cantidad absorbida por éstas (Lindsay y Cox, 1985).

En este caso, dependiendo del analito a determinar, se utilizaron dos tratamientos: i) acetato de amonio 1M que es el extractante utilizado como método de rutina prácticamente universal para determinar la CIC de los suelos (Soil Survey Staff, 1999), se utilizó para la determinación de los elementos mayoritarios, Ca, Mg, K y Na; ii) ácido nítrico 1M: utilizado para la extracción de nutrientes en general, se empleó para cuantificar los demás elementos: Ba, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Sr.

En la Tabla 6 se pueden observar las concentraciones de los analitos obtenidas por los tratamientos convencionales de extracción disponible de nutrientes. El orden de concentraciones encontradas es el siguiente: $K > Fe > P > Mn > Ca > Ba > Sr > Mg > Cu > Na > Ni$. A partir de este orden y comparándolo con el obtenido a partir de las concentraciones totales, se puede inferir que, si bien hay pequeñas diferencias en el orden de concentración de algunos de los analitos, existe en general una correlación entre las concentraciones disponibles y las totales.

Considerando como el 100 % la concentración para el tratamiento de digestión total, se calculó el porcentaje de disponibilidad (PD) para cada analito. En base a los resultados obtenidos se observó que el Ca presentó mayor PD con 44,8 %, mientras que el menor PD se obtuvo para el Na con un 3,18 %. Según el PD en orden decreciente es: $Ca > Ba > K > Sr > Cu > Mn > Ni > Mg > P > Fe > Na$.

Tabla 6. Concentraciones medias expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ y sus respectivos intervalos de confianza para: digestión total ($\text{HNO}_3:\text{HCl}$), tratamiento de extracción convencional correspondiente (HNO_3 diluido o Ac.NH_4) y tratamientos de extracción propuestos con DES.

Analito	Tratamientos de extracción												t *				
	Digestión total			Propuestos													
	$\text{HNO}_3:\text{HCl}$	Convencional		DES 1			DES 2			DES 3				DES 4			DES 6
Ba	151 ± 7	65 ± 5	A	15 ± 6	B	68 ± 6	A	20 ± 15	B	47 ± 7	B	55 ± 17	B				
Ca	165 ± 28	74 ± 10	A	20 ± 14	B	108 ± 8	B	26 ± 19	B	84 ± 23	A	65 ± 44	A				
Cu	20 ± 2	5,4 ± 0,4	A	0,5 ± 0,5	B	< LOD	B	1,6 ± 0,2	B	2 ± 1	B	< LOD	B				
Fe	4690 ± 267	164 ± 4	A	16 ± 20	B	1453 ± 284	B	196 ± 18	B	96 ± 50	A	74 ± 14	B				
K	4208 ± 341	1918 ± 182	A	194 ± 409	B	1540 ± 10	B	486 ± 95	B	1317 ± 40	B	1172 ± 167	B				
Mg	131 ± 13	10 ± 2	A	1,3 ± 1,5	B	25 ± 4	B	13 ± 2	A	16 ± 2	B	15 ± 5	A				
Mn	460 ± 23	83 ± 19	A	33 ± 31	B	253 ± 4	B	33 ± 27	B	63 ± 10	A	133 ± 61	A				
Na	22 ± 4	0,7 ± 0,2	A	< LOD	B	1,2 ± 0,2	B	0,4 ± 0,1	A	1,3 ± 0,1	B	< LOD	B				
Ni	4,37 ± 0,05	0,7 ± 0,3	A	0,13 ± 0,01	B	1,9 ± 0,2	B	0,19 ± 0,01	B	0,56 ± 0,14	A	0,3 ± 0,1	B				
P	3748 ± 2453	137 ± 5	A	43 ± 43	B	126 ± 27	A	72 ± 7	B	65 ± 22	B	< LOD	B				
Sr	88 ± 8	24 ± 4	A	1,8 ± 1,8	B	34 ± 3	B	19 ± 8	A	19 ± 5	A	24 ± 13	A				

* prueba t: letras iguales no existen diferencias significativas, letras diferentes existen diferencias significativas

3.5.1.1 COMPARACIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS CONVENCIONALES Y PROPUESTOS

Con el fin de encontrar una alternativa a los métodos de extracción convencionales para la evaluación de nutrientes disponibles en suelos, se propuso la utilización de diferentes DES. Las muestras del suelo en estudio se sometieron al tratamiento indicado en la sección 2.6.4 y las concentraciones obtenidas se utilizaron para evaluar si los tratamientos con DES eran comparables al tratamiento convencional. Para ello se compararon los resultados de concentraciones elementales obtenidas con el tratamiento convencional: extracción con acetato de amonio para los cationes mayoritarios o de intercambio (Ca, Mg, Na y K) y extracción con HNO₃ diluido para los cationes minoritarios; con aquellas obtenidas a partir de los diferentes DES (1, 2, 3 y 4). En la Figura 8 se pueden visualizar los gráficos de barras en los cuales se representa la concentración obtenida para cada elemento en cada tratamiento con sus respectivas barras de error correspondientes a los intervalos de confianza.

Evaluando los gráficos de barra es visible que la capacidad de extracción es diferente para cada DES y que depende de cada elemento analizado. Teniendo en cuenta que cada DES está formado por diferentes reactivos, se puede inferir que cada uno presenta mayor afinidad por algunos metales que por otros, evidenciando de esta forma, marcadas diferencias entre los elementos determinados en cada tratamiento (Handy S., 2005). También se observa que el DES 1 carece de una efectiva capacidad de extracción de metales en las muestras de suelo, ya que a partir de la extracción con este tratamiento se obtuvieron diferencias para todos los analitos estudiados. Además, observando las concentraciones para un mismo elemento, los tratamientos con los DES también presentan diferencias respecto al tratamiento convencional en algunos casos.

Con el fin de aseverar si las diferencias observadas son o no significativas, se realizó un prueba t ($p < 0,05$) de comparación de medias. En la Tabla 6 se observan los resultados de la prueba t en donde se indica con las mismas letras cuando no existen diferencias significativas y con letras diferentes cuando si existen diferencias significativas en función al tratamiento convencional HNO₃ o AcNH₄ según corresponda. Así, se determinó que el DES 1 presentó diferencias significativas para todos los elementos, el DES 2 no mostró diferencias significativas para Ba y P, de la misma manera que el DES 3 para Mg, Na y Sr y

el DES 4 para Ca, Fe, Mn, Ni y Sr. En coincidencia, todos los DES exhibieron diferencias significativas para el Cu y K.

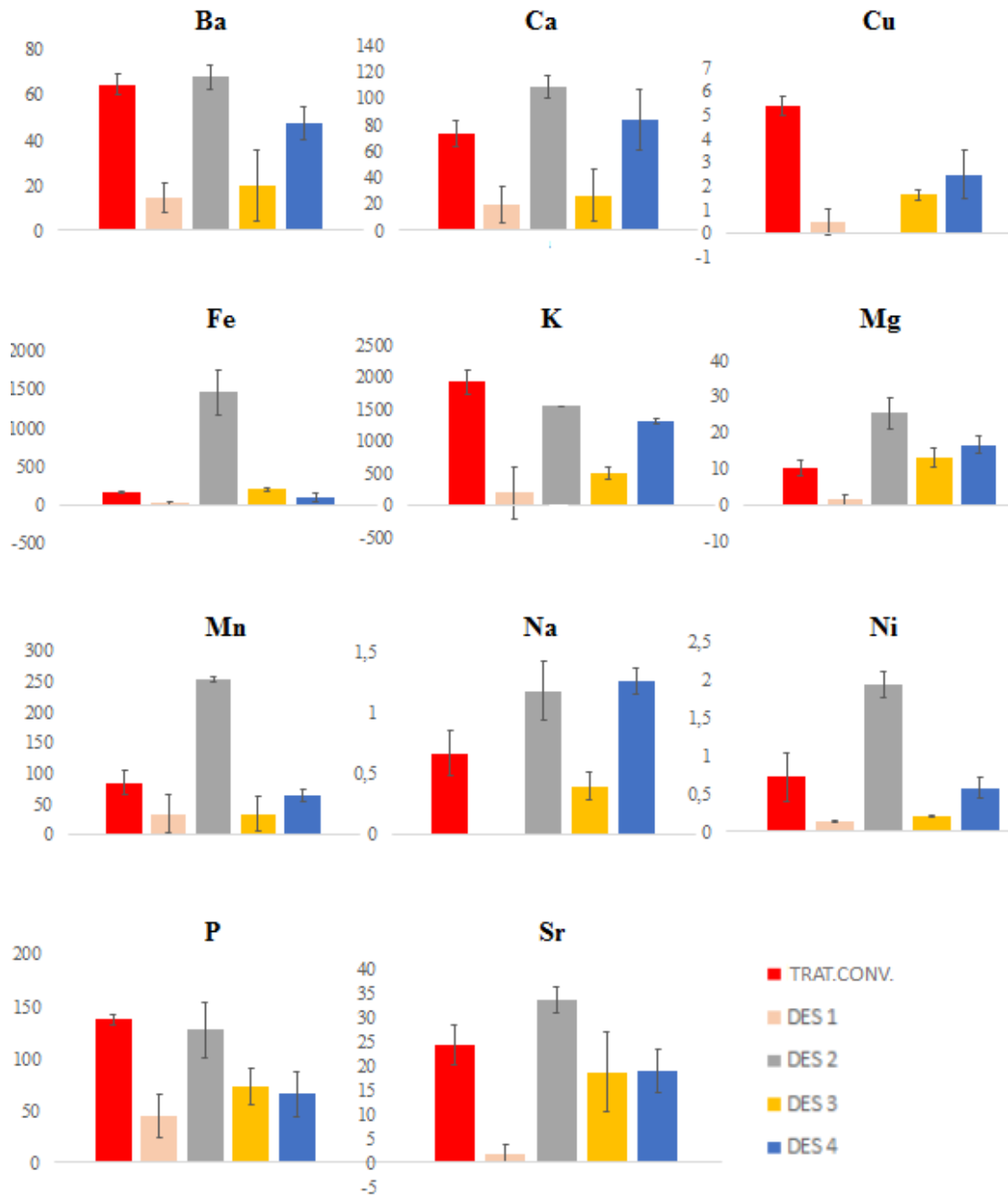


Figura 8. Concentraciones de elementos disponibles en suelo, a partir de muestras tratadas con el tratamiento convencional (rojo) y tratadas con los DES 1 (rosa), 2 (gris), 3 (amarillo) y 4 (azul) con sus respectivas barras de error.

3.5.1.2 RELACIÓN ENTRE pH Y DISPONIBILIDAD

El pH es una de las mediciones químicas más importantes que se puede hacer en el suelo. A pesar de su simplicidad, no solo indica si el mismo es ácido, neutro o alcalino, sino que aporta información básica para conocer su potencial agrícola, estimar la disponibilidad de nutrientes esenciales y posible toxicidad de otros elementos. Permite predecir los cationes dominantes en los coloides del suelo y está involucrado en la retención de plaguicidas, factor importante al evaluar la contaminación de suelos y agua y/o persistencia (Azcarate et al., 2012).

Un pH de suelo mayor a 6 indica suficiente cantidad de bases en el complejo de intercambio. A valores de pH entre 6 y 8,5 calcio y magnesio dominan las superficies coloidales, mientras que a pH mayores de 8,5 el sodio es el catión dominante. La asimilación de nutrientes del suelo es afectada por el pH. La mayor disponibilidad de nutrientes se da a pH entre 6 y 7,5 pero depende de cada cultivo (Porta et al., 1999).

En base a estos conocimientos, se determinó el pH del suelo estudiado en una relación agua:suelo de 1:2,5 y se obtuvo un valor de 6,83. Considerando que la mayor parte de la Región Semiárida Pampeana (RSP) está representada por valores de pH que oscilan entre 6,2 y 7,5 (Marschner, 1995), el valor obtenido coincide con los valores descriptos para esta región. La Figura 7 presenta la disponibilidad de algunos nutrientes en función del pH. Si se comparan los nutrientes disponibles con los analitos encontrados en el suelo estudiado se evidencia coincidentemente la presencia de: P, K, Ca, Mg, Fe, Mn y Cu. Como ya se mencionó, a partir de la metodología propuesta no se pudo determinar Zn, ya que los valores obtenidos fueron menores al LOD para poder cuantificarlo, sin embargo, por esta razón tampoco se puede confirmar su ausencia.

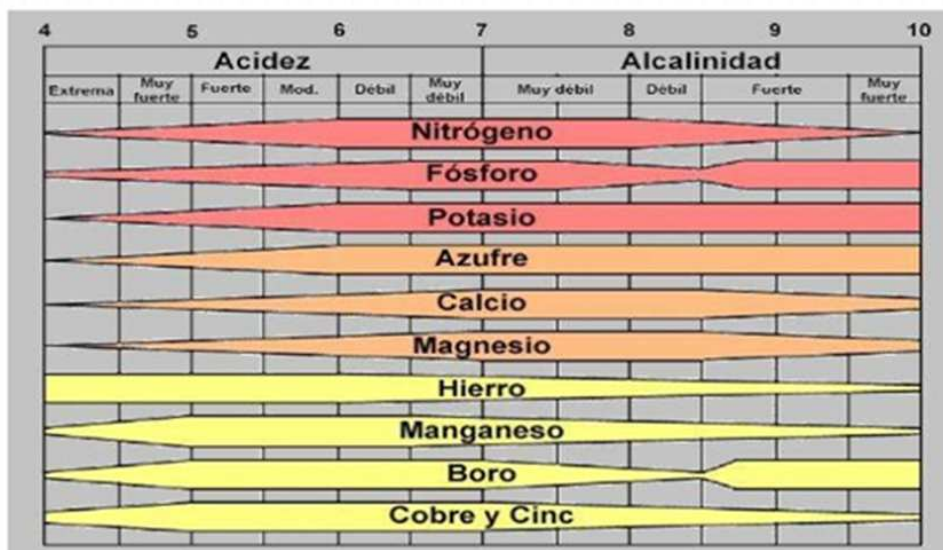


Figura 7. Disponibilidad de nutrientes en función del pH (Adaptado de Picone 2005).

3.5.2 DIGESTIÓN TOTAL

A partir del tratamiento realizado mediante la digestión ácida con $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (1:3) se pueden observar concentraciones mucho mayores que los demás tratamientos, esto se debe a que se produce una descomposición total de la muestra, es decir, tanto la extracción de cationes disponibles como de no disponibles (Tabla 6). Este análisis, tiene como objetivo conocer el contenido total de elementos nutritivos; cuyos resultados obtenidos permitirán hacer una apreciación sobre la abundancia y distribución de los elementos en el suelo estudiado (Ulloa Guitán, 2001). Por tanto, y tal como se mencionara previamente, el contenido total de un nutriente en un suelo no da idea de la cantidad que está disponible para la planta.

El orden de concentraciones encontradas es el siguiente: $\text{Fe} > \text{K} > \text{P} > \text{Mn} > \text{Ca} > \text{Ba} > \text{Mg} > \text{Sr} > \text{Na} > \text{Cu} > \text{Ni}$. Es importante destacar que las concentraciones totales para Ba, Cu y Ni coinciden en los rangos informados recientemente por otros autores que analizaron otros suelos argentinos (Morales Del Mastro et al., 2014).

3.6. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

Para el estudio de la exactitud se preparó un conjunto de validación de patrones con concentraciones conocidas de los analitos de interés y que fueron diferentes a las utilizadas en la etapa de calibración. Luego se determinó la concentración de los analitos en cada uno de los tratamientos por interpolación en la recta de calibrado, y se analizó la exactitud de las determinaciones a través de la recuperaciones de las concentraciones nominales del analito.

Luego de la verificación de la homocedasticidad de los datos se procedió a determinar el intervalo de confianza conjunto entre la pendiente y la ordenada al origen. Este intervalo es una región en el plano de las dos variables (pendiente y ordenada al origen) que tiene forma elíptica. Por este motivo, la prueba estadística consiste en investigar si el punto (1,0) está contenido en la región elíptica de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada al origen. La prueba se conoce como EJCR (por *elliptical joint confidence region*), luego de realizarla se obtiene un gráfico bidimensional de la región mediante el cual se verificar si contiene al punto (1,0). Es importante remarcar que el tamaño de la elipse, que está controlado, entre otros parámetros, por el desvío estándar de la regresión, da una idea de la precisión del método analítico que se está probando (González et al., 1999). Por lo cual se puede realizar la comparación de la exactitud y la precisión del método propuesto respecto al método convencional. La Figura 9 muestra la región para los analitos que no presentaron diferencias significativas con respecto al tratamiento de referencia y se comparan con las regiones obtenidas para este último.

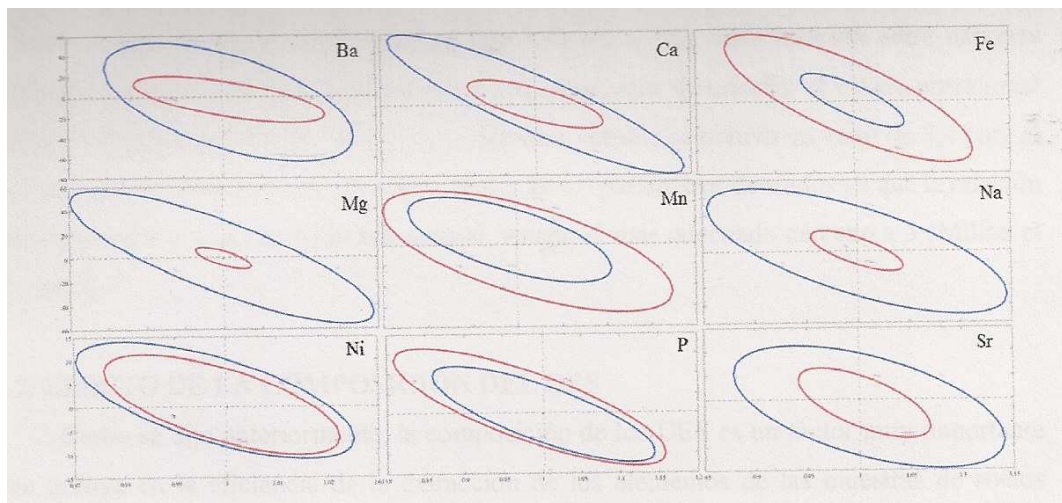


Figura 9. EJCR (*elliptical joint confidence region*) (95% nivel de confianza) para la pendiente y ordenada al origen obtenidas en la regresión individual de cada analito: tratamiento convencional (rojo), tratamiento propuesto (azul). La intersección indica el punto teórico (ordenada al origen = 0, pendiente = 1).

Evaluando y comparando las regiones se puede concluir que ambos tratamientos son exactos ya que todos contienen al punto (1,0), pero presentan diferencias en la precisión para la determinación de cada analito. Para Ba, Ca, Mg, Na y Sr el método convencional exhibe elipses (rojas) con menor tamaño indicando una mayor precisión comparando con el tamaño de las elipses (azules) obtenidas a partir del tratamiento propuesto. Por el contrario el método propuesto muestra una mayor precisión respecto a la determinación de Fe, Mn, y P respecto al tratamiento convencional. La mayor variabilidad presentada en los resultados obtenidos a partir de los tratamientos con los DES puede ser relacionada al proceso del tratamiento de las muestras ya que un paso importante del mismo es la utilización del baño ultrasónico. Hay que tener en cuenta que la posición de las muestras en el baño puede intervenir, ya que todas las muestras quedan posicionadas en diferentes lugares del baño y la energía de las ondas ultrasónicas que recibe cada una puede ser distinta, variando de esta manera la eficiencia de la extracción de los analitos (Krug et al., 2016; Richter et al., 2016).

En términos generales, las concentraciones encontradas de elementos disponibles en las muestras del suelo estudiado para P, Fe y Cu se encuentran en el orden a las informadas en otro trabajo (Ulloa Guitan et al., 2001). Por otra parte las concentraciones de Ca y Mg no pueden ser comparadas porque fueron mucho mayores que las halladas en el presente estudio, lo cual puede estar vinculado a las características propias del suelo estudiado; sin embargo, a fines comparativos, se puede emplear la relación Ca/ Mg. Esta relación entre

cationes intercambiables, es utilizada habitualmente con propósitos de estudiar el estado nutricional de los suelos (Azcarate et al., 2017). En el presente estudio se obtuvo un valor de 7,4 para el suelo analizado. Este valor se encuentra dentro de los parámetros deseados ya que la relación Ca/Mg entre 3 y 15 es considerada normal, siendo el más adecuado cercano a 5 (Millán et al., 2010).

3.7. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL DES

Como se dijo anteriormente, la composición de los DES es un factor muy importante que influye en la eficiencia de la extracción de los elementos de las muestras de suelos (Habibi et al., 2013; Yilmaz y Soylak, 2015). Con el objetivo de evaluar la influencia de este factor y considerando que el DES 4 fue el tratamiento que mayor cantidad de cationes extrajo sin presentar diferencias significativas con el tratamiento convencional, se sintetizó un DES 6 con la misma composición que el DES 4 (cloruro de colina: urea) pero en una relación 1:4.

Para ello se compararon las concentraciones alcanzadas por el DES 6 con las obtenidas por los tratamientos convencionales a través de una prueba t de comparación de medias. Las respectivas concentraciones y comparaciones se muestran en la Tabla 6 y a partir de las mismas se observa que la extracción no mejoró con el cambio en la composición del DES, evidenciándose diferencias significativas con los tratamientos convencionales en la mayoría de los elementos. A partir de este análisis, se concluye que al igual que el DES 4, el DES 6 no presentó diferencias significativas para Ca, Mn y Sr, como así tampoco para Mg, pero no superó su eficiencia de extracción.

Por este motivo, la evaluación de otras relaciones molares será un punto a profundizar para estudios futuros, en base a que las diferencias en la eficiencia de extracción ya han sido demostradas para diferentes relaciones de otros DES (Abbott et al, 2006.; Ghanemi et al, 2014.; Matong et al., 2017).



CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN

4.1. CONCLUSIONES

- Se logró la cuantificación de los elementos biodisponibles en suelo mediante un adecuado método de extracción utilizando diferentes DES.
- Esta alternativa, presentó una novedosa extracción de metales disponibles en suelo. De 11 elementos cuantificados, 9 no presentaron diferencias significativas con los tratamientos convencionales.
- El tratamiento DES 4 demostró ser el más eficaz para el tipo de suelo estudiado, con adecuados LOD y LOQ y menores diferencias significativas en comparación a los métodos convencionales utilizados para la determinación de elementos disponibles en suelo.
- Los métodos convencionales presentaron algunas ventajas respecto a la precisión en comparación con los DES para ciertos elementos, sin embargo estos últimos justifican su utilización en el interés de la química verde, contribuyendo al desarrollo de una química más limpia y sustentable.

Por todo lo expuesto, en esta tesis se ha demostrado las bondades que presentan las soluciones eutécticas con fines extractivos, que poseen ventajas en relación a los métodos convencionales. En virtud de la amplia gama de compuestos eutécticos sintetizables, será necesario realizar nuevos estudios sobre el diseño de solventes para optimizar el rendimiento, selectividad, solubilidad del sustrato, etc, por lo que hay un largo camino que indagar y trabajar en esta temática novedosa y que ha ido tomando importancia en los últimos años.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., McKenzie, K.J., Obi, S.U. (2006). Solubility of metal oxides in deep eutectic solvents based on choline chloride. *J. Chem. Eng. Data* 51 (4), 1280–1282
- Agilent. (2016).
http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/2.Nuevo_Plasma_de_Microondas_Agilent_4100_MP-AES.pdf.
- Aki S., Brennecke J. Samanta A. (2001). *Chemical Communications* 5, 413.
- Alloway, B.J. (1995). *Heavy metals in soils*. Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall. Glasgow, 368 pp.
- Alvarez, H.F.F. (2010). *Muestreo y metodologías de análisis con fines de fertilidad*. Colombia, Multilab Agroanalítica.
- Azcarate P., Kloster N. y Pérez Habiaga G. (2012) *Reacción del suelo: pH*. EEA Anguil “Ing. Agr. Guillermo Covas”. 2, 19-25.
- Azcarate P., Baglioni M., Brambilla C., Brambilla E., Fernandez R., Kloster N., Noellemeyer E., Ostinelli M., Pérez M., Quiroga A. y Savio M. (2017). *Métodos de análisis e implementación de calidad en el laboratorio de suelos*. EEA Anguil INTA “Kloster Nancy”
- Boumans P.W.J.M. (1987). *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy. Part 2. Applications and Fundamentals*. John Wiley & Sons.
- Butcher D. J., Sneddon J. (1998). *A practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley – Interscience.
- Burriel Martí F., Lucena Conde F., Arribas Jimeno S. y Hernández Méndez J. (2008). *Química Analítica Cualitativa Ed. Paraninfo 18ª edición*
- Carmichael A., Seddon K., (2000). *Journal of Physical Organic Chemistry* 13, 591.
- Clayton C. A., Hines J. W. y Elkins P. D. (1987). *Detection limits with specified assurance probabilities*, *Anal. Chem* 59, 2506-2514.
- Currie L. A., *Recommendations in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities*, *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, 1699-1723.

- d'Huicque L. y Gomez J. Disolución- Disgregación (2014). Química Analítica I. Ciencias Químicas, Tecnología de Alimentos, Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano.
- Docherty K., Kulpa J. (2005). *GreenChemistry*. 7, 185.
- Franco Vega A., Palou E., Ramirez Corona N. y Lopez Malo A. (2014). Líquidos Iónicos: una alternativa “verde” para procesos de extracción en la industria de alimentos.
- Freemantle M. (2010). *An introduction of Ionic Liquids*, Cambridge, UK..
- Ghanemi, K., Navidi, M.A., Fallah-Mehrjardi, M., Dadolahi-Sohrab, A. (2014). Ultra-fast microwave-assisted digestion in choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, Ni and Zn in marine biological samples. *Anal. Methods* 6 (6), 1774–1781
- Guerrero N. (2015). *Ensayo de Digestion Acida Document.mx*
- Goncalves I.M., Murillo M., González A.M. (1998). Determination of metals in used lubricating oils by AAS using emulsified samples. *Talanta*, 47 1033–1042.
- González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. (1999) *Talanta*, 48, 729–736.
- Gordon C. (2001). *Applied Catalysis A; General* 222, 101.
- Habibi, E., Ghanemi, K., Fallah-Mehrjardi, M., Dadolahi-Sohrab, A. (2013). A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples. *Anal. Chim. Acta* 762, 61–67.
- Handy S. (2005). *Current Organic Chemistry* 9,959.
- Harris D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.
- Herber R.F.M. and Stoeppler M. (1994). *Trace Element Analysis in Biological Specimens*. Elsevier, Amsterdam, 21-52.
- Jaramillo, D. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín: 321.
- Jiao J., Gai Q., Fu Y., Zu Y., Luo M., y Zhao C. (2013). Micro-wave- assisted ionic liquids treatment followed by hydro- distillation for efficient isolation of essential oil from *Fructus forsythiae* seed. *Separation and Purification Technology*, 107, 228-237.
- Jordán López, A. (2016). *Manual de edafología*. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla: 130.

- Juma, N. G. (1998). The pedosphere and its dynamics: A systems approach to soil science. Quality Color. Press Inc. Edmonton, Canada.
- Koel M. (2000). Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry 49, 145.
- Krug F.J., Piovezani Rocha F, R. (2016). Metodo de preparo de amostras para análise elemental. Sociedade Brasileira de Química. Brasil.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesilski, H. & Proix, N. (1996). Inétreèt de differents réactifs d'extraction chimique por l'evaluation de la disponibilité des métaux en traces du sol. Agronomie, 16: 201-215.
- Lindsay W.L. and Cox F.R (1985). Micronutrients soil test for tropics. Fertilizer Research, 7: 169-200.
- Liu R., Liu J., Yin Y. (2009). Analytical and Bioanalytical Chemistry 393, 871,
- Marschner H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants Academic Press. Second Edition, 889.
- Matong Joseph M., Nyaba Lauthando, Nomngongo Philiswa N. (2017). Determination of As, Cr, Mo, Sb and V in agricultural soil samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after simple and rapid solvent extraction using choline chloride-oxalic acid deep eutectic solvent. Ecotoxicology and Environmental Safety.
- Millán R., Schmid T., Sierra M.J., Carrasco-Gil S., Villadóniga M. Rico C., Sánchez Ledesma D.M. Díaz Puente F.J. (2010). Spatial variation of biological and soil properties in an area affected by a metallurgical mercury plant: Almadenejos (Spain). Applied Geochemistry 26, 174-181.
- Morales Del Mastro A., Pereyra M., Londonio A., Pereyra V. (2014). Chemical profile of size- fractionated soil collected in a semiarid industrial area of Argentina. Atmospheric Environment 98 299-307. Buenos Aires, Argentina.
- Mukhopadhyay S., Mukherjee S., Adnan N.F. (2016). Ammonium-based Deep eutectic solvents as novel soil washing agent for lead removal. Chemical Engineering Journal.
- Olivieri A. C. (2014). Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. Chem. Rev. 114, 5358–5378

- Paiva S., Craveiro R., Aroso I. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents- Solvents for the 21st Century. Sustainable Chemistry & Engineering.
- Porta J., López Acevedo M. y Roquero C. (1999). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Muni-Prensa.
- Richter R.C., Nóbrega J.A., Pirola C. (2016). Think Blank Clean Chemistry Tools for Atomic Spectroscopy. Milestone Srl and Ikonos Srl. 1st Edition.
- Rodríguez O., Rodríguez A. (2002). Comparación de la CIC en dos suelos, utilizando Acetato de Amonio, Acetato de Sodio y Cloruro de Amonio. Revista de la Facultad de Agronomía (Caracas).
- Rogers R., Seddon K. (2003). SCIENCE 302, 792.
- Romero Salvador A. (2008). Líquidos Iónicos a temperatura ambiente: un nuevo medio para las reacciones químicas. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España). 79-90.
- SAMLA. (2004). Sistema de apoyo metodológico a los laboratorios de análisis de suelos, agua, vegetales y enmiendas orgánicas. pH del suelo. SAGyP, Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.
- Seddon K. (1997). Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 68, 351.
- Singh G. Kumar A. (2008). Indian Journal of Chemistry. 47, 495.
- Skoog A., Holler F. J., Crouch S. R. (2008). Principios de análisis instrumental. Cengage Learning Editores.
- Ulloa Guitán M., Abreu C. A y Paz González A. (2001). Disponibilidad de macro- y micronutrientes en un suelo de cultivo de Mabegondo (A Coruña).
- Vázquez M. E. (2005). Acidez del suelo Tecnologías en análisis de suelos. Liliana Marban y Sivia Ratto. Buenos Aires: AACCS. 69-88.
- Wilrich P. (1995). ISO/DIS 11843-1,2 Capability of Detection, ISO/TC69/SC6, ISO Standard, 11843-1, 1977.
- Yilmaz, E., Soylak, M. (2015). Ultrasound assisted-deep eutectic solvent extraction of iron from sheep, bovine and chicken liver samples. Talanta 136, 170–173.
- Zamora Rivas, B. (2006). Los Suelos.
- <https://es.scribd.com/doc/91230155/Ensayo-Digestion-Acida>