



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

Universidad Nacional de La Pampa

**“VALIDACIÓN DE UN PROTOTIPO DE EQUIPO PARA
LA EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA DE
MICRONUTRIENTES EN SUELOS PAMPEANOS”**

BRUNELLO, Daiana Berenice

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER

EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA EN QUÍMICA

SANTA ROSA, LA PAMPA ARGENTINA, 2023

PRÓLOGO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química 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 laboratorio de Suelo y Agua dependiente de INTA Anguil y en el laboratorio de Espectrometrías Atómicas dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre el 26/04/19 y 30/06/23 bajo la dirección de la Dra. SAVIO, MARIANELA y bajo la co-dirección de la Dra. KLOSTER, NANCI.

Brunello, Daiana.

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

28/08/23

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de tesis por su apoyo y acompañamiento a lo largo de esta etapa.

A mi co-Directora, quien me ha guiado con su sabiduría y mucha dedicación y paciencia durante todo el trabajo de laboratorio y escritura.

A la institución y al personal del Laboratorio de Suelo y Agua de la EEA Anguil “Ing. Ag. Guillermo Covas” INTA, por permitirme llevar a cabo parte del desarrollo de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, por haberme dado un lugar y permitido formarme profesional y personalmente, para obtener mi título de Licenciado en Química.

Y, por último, quiero dar las gracias a mi familia y amigos, quienes han estado apoyándome siempre para que pueda lograr este título.



Brunello, Daiana Berenice

28/08/2023

RESUMEN

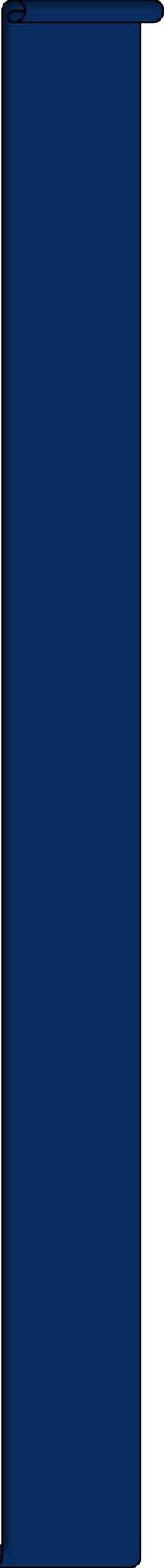
El contenido de nutrientes en el suelo es de gran interés para la agricultura ya que condiciona el crecimiento y rendimiento de los cultivos, especialmente en la Región Semiárida Pampeana, donde los suelos son predominantemente francos a arenosos y pueden limitar el rendimiento. Sin embargo, la extracción de nutrientes del suelo en los laboratorios de ensayo agropecuarios es una etapa crítica y no hay equipos de laboratorio que se ajusten a las necesidades de los ensayos debido a la especificidad del análisis y las abundantes muestras a analizar. Con el fin de disminuir los tiempos de trabajo, en el presente estudio se desarrolló y optimizó un prototipo de equipo para la extracción de micronutrientes (Zn, Cu, Fe y Mn) en múltiples muestras. El uso de este método se validó frente al método de extracción convencional de agitación, centrifugación y filtración. Para ello, se utilizaron dos soluciones extractoras ampliamente usadas para la determinación de micronutrientes en el suelo: ácido dietilen-triamino-pentacético y trietanolamina (DTPA-TEA) y Mehlich III. Se cuantificó la concentración de micronutrientes presentes en las muestras mediante el uso de dos técnicas de espectrometría: absorción atómica con llama (FAAS) y emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES). Los resultados demostraron que las concentraciones de Zn, Cu, Fe y Mn en los suelos estudiados están dentro del rango observado habitualmente y que el uso del prototipo para la extracción múltiple de elementos arroja valores comparables al método de extracción convencional.

SUMMARY

The content of nutrients in the soil is of great interest for agriculture since it conditions the growth and yield of crops, especially in the Semiarid Pampas region, where the soil predominantly loamy to sandy and can limit the yield. However, the extracting nutrients from the soil in the agricultural test laboratories is a critical step and there are not laboratories equipment that fit the needs of test due to the specificity of test and how much simple to do. With the purpose of less the work time, in the present study it developed and optimizing an equipment prototype for micronutrients extraction (Zn, Cu, Fe, and Mn) in multiple samples. The use of this method was validated to conventional extraction method. Two extracted solutions widely used for determination of soil micronutrients were selected: diethylene-triamine-pentaacetic acid and triethanolamine (DTPA-TEA) and Mehlich III. The micronutrients concentration present in the samples were assessed using two spectrometric techniques: flame atomic absorption (FAAS) and microwave induced plasma optical emission (MIP-OES). The results showed that the concentrations of Zn, Cu, Fe, and Mn in the studied soils are within the typically observed range in soils from semiarid regions and the use of the prototype for multiple element extraction is comparable to the conventional extraction method.

INDICE

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	7
1.1. EL SISTEMA SUELO	8
1.2. NUTRIENTES DEL SUELO	8
1.3. ANÁLISIS DE SUELO	10
1.3.1. <i>Soluciones para la extracción de nutrientes del suelo</i>	10
1.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE NUTRIENTES: ESPECTROMETRÍAS ATÓMICAS.	12
1.4.1. <i>Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (FAAS)</i>	12
1.4.2. <i>Espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)</i>	16
1.5. HIPÓTESIS.....	19
1.6. OBJETIVO	20
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. MUESTRAS DE SUELO	22
2.2. INSTRUMENTAL	22
2.3. REACTIVOS Y SOLUCIONES	23
2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	24
2.4.1. <i>Método convencional de agitación, centrifugación y filtración</i>	24
2.4.2. <i>Método de extracción propuesto: cuba de extracción</i>	25
2.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE VALIDACIÓN.....	26
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN: DTPA-TEA Y MEHLICH III.....	29
3.2. EVALUACIÓN DE LA CUBA COMO MÉTODO DE EXTRACCIÓN	31
3.3. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN: FAAS Y MIP-OES	34
3.4. APLICACIÓN ANALÍTICA A SUELOS PAMPEANOS	3
CAPÍTULO IV CONCLUSIÓN.....	5
4.1. CONCLUSIONES	6
BIBLIOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema suelo

A medida que se ha estudiado acerca de los componentes del suelo y cómo interactúan entre sí, ha habido cambios en la forma en que se entiende y define el término "suelo" (Jordán López, 2005). El suelo es un recurso natural fundamental para la producción de alimentos, ya que es el medio en el que las raíces de las plantas absorben agua y nutrientes necesarios para el desarrollo de un cultivo. (Álvarez, 2015). Es un sistema abierto, dinámico, constituido por tres fases: sólida, líquida y gaseosa (Quiroga & Romano, 2012).

El suelo consiste en una mezcla de partículas minerales de diferentes tamaños y materia orgánica que proviene de la descomposición de restos vegetales y animales. Estos materiales forman agregados con las partículas minerales y forman poros entre ellos, lo que representa aproximadamente la mitad del volumen total del suelo. La materia orgánica es de gran importancia para la calidad del suelo, ya que favorece la formación de agregados y poros, proporciona nutrientes a las plantas y energía a los microorganismos (Álvarez, 2015).

En los últimos años, en Argentina, la producción agrícola y ganadera ha experimentado diversos cambios significativos y constantes en el suelo (Álvarez, 2015). En la Región Pampeana se ha observado que la explotación intensiva del suelo ha generado una disminución significativa de los nutrientes presentes en él, debido a la expansión de la agricultura y la ganadería (Miretti et al., 2012). Esto es un problema, especialmente en esta región, porque predominan los suelos de texturas franco arenoso, arenoso franco y franco (Quiroga & Romano, 2012).

1.2. Nutrientes del suelo

El suelo es utilizado como la base principal para suministrar nutrientes a las plantas (Praveen Sarojam, 2009). Existen diversos factores presentes en el suelo que pueden influir en el crecimiento vegetal, uno de los más importantes es la disponibilidad de los nutrientes (Rimski-Korsakov & Álvarez, 2016). La concentración y disponibilidad de nutrientes minerales puede alterarse en el suelo mediante la aplicación de fertilizantes, la lixiviación y también a su vez, la cosecha de los cultivos y el crecimiento de las plantas conllevan a la eliminación de grandes cantidades de nutrientes minerales del suelo. Por lo que es importante realizar un análisis del suelo para obtener la información necesaria para mantener la fertilidad óptima a lo largo del tiempo (Praveen Sarojam, 2009).

En general, las plantas necesitan una variedad de nutrientes para crecer y prosperar, siendo los macronutrientes como el Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K), Calcio (Ca),

Magnesio (Mg) y Azufre (S) esenciales en grandes cantidades. Mientras que otros nutrientes, como el Hierro (Fe), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo), Boro (B), Cobre (Cu), Manganeseo (Mn), Cloro (Cl), Aluminio (Al), Sodio (Na) y Cobalto (Co), conocidos como micronutrientes, son necesarios en cantidades menores, pero aún son vitales para el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas. Por lo tanto, es importante asegurar que las plantas tengan acceso a una variedad de nutrientes esenciales para mantener una buena salud y productividad (Fontanetto & Bianchini, 2010).

Para establecer la importancia esencial de los nutrientes minerales para el crecimiento de las plantas, investigadores realizaron experimentos en los que se comparó el crecimiento y los síntomas visuales de deficiencia en plantas cultivadas en agua y arena que recibieron soluciones nutritivas completas y soluciones nutritivas a las cuales se les eliminó elementos específicos. A partir de estos experimentos, se identificaron como micronutrientes esenciales para las plantas los siguientes elementos: Fe, Mn, Cu, Mo, B, Cl y Ni (Kirkby & Römheld, 2007). En los últimos años, ha habido un aumento en el interés por parte de expertos en fisiología vegetal, nutrición y agronomía en general en los micronutrientes. Esto se debe a que, en muchos sistemas agrícolas, los micronutrientes pueden limitar el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Además, es necesario mantener niveles adecuados de micronutrientes en las plantas para que los nutrientes macro como el N y el P, que se aplican en forma de fertilizantes, sean utilizados de manera eficiente por las plantas (Kirkby & Römheld, 2007).

Estos elementos químicos que están presentes en el suelo, se pueden encontrar en distintos compartimentos como: la fase sólida, donde pueden estar inmovilizados en una red cristalina, aluminosilicatos amorfos o compuestos orgánicos; en la fase líquida, disueltos en la solución del suelo o también en la interfase sólido-líquido, donde los elementos se localizan en la superficie de las partículas y se mantienen en contacto íntimo con la solución a través de la adsorción, que es la asociación de una partícula (ión) a la superficie de un sólido. Este último es comúnmente denominado 'complejo de cambio', también conocido como sistema responsable del proceso de intercambio. Está formado principalmente por arcillas y materia orgánica humificada, y tiene una carga neta negativa o positiva que le permite la adsorción de cationes o aniones. Cada tipo de catión / anión tiene su propio equilibrio entre la solución del suelo y el complejo de cambio, que depende de factores como la carga y el tamaño del ión, la competencia con otros iones y la composición de los componentes del complejo de cambio (Jordán López, 2005).

Un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de realizar un análisis de suelo es el pH, que indica el grado de acidez del suelo y es fundamental para el crecimiento de las plantas debido a que afecta la disponibilidad de nutrientes (Fontanetto & Bianchini, 2010). Las sales de Mn, Fe y Zn generalmente suelen ser más solubles en suelos ácidos que en suelos alcalinos. Sin embargo, en suelos muy ácidos, la alta solubilidad de compuestos de Al, Fe, Zn, Mn o Ni puede ser tóxica para las plantas. Además, en los suelos alcalinos que contienen carbonatos, se dificulta la solubilidad y asimilación de elementos tales como el Fe, Zn, Mn y Cu (Jordán López, 2005). Estos micronutrientes, generalmente se encuentran en la solución del suelo como cationes libres o formando quelatos y como se dijo anteriormente se vuelven más disponibles para las plantas cuando el suelo es ácido. Aunque en otras condiciones pueden adherirse fuertemente a la fase sólida por lo que son poco móviles y hace que su concentración en la solución del suelo sea baja (Gutierrez Boem, 2016).

1.3. Análisis de suelo

Los análisis de suelo con propósitos de evaluar su fertilidad buscan identificar qué nutrientes son deficientes en un sitio específico y, en la medida de lo posible, calcular la cantidad de fertilizante que se requiere si fuera necesario (Lindsay, 1985). La adecuada gestión de los nutrientes en el suelo tiene importantes consecuencias en la producción, economía y ecología. Es necesario encontrar un equilibrio entre mantener una alta fertilidad del suelo para lograr una cosecha de calidad y minimizar el riesgo de contaminación del medio ambiente. Los fertilizantes representan una parte significativa de los costos de producción agrícola, por lo que es importante utilizarlos de manera efectiva y responsable (Kazimierz Kęsika, 2005).

Cuando se trata de micronutrientes, los análisis de suelo se vuelven más complejos debido a que las plantas requieren cantidades relativamente pequeñas de estos elementos, y cualquier alteración en la muestra o el proceso de análisis puede tener un gran impacto en los resultados. Además, estas cantidades en la solución del suelo son muy escasas y a menudo están por debajo del límite de detección analítica (Lindsay, 1985).

1.3.1. Soluciones para la extracción de nutrientes del suelo

Los suelos contienen cationes y aniones intercambiables que representan una reserva inmediata de nutrientes disponibles para las plantas (factor de capacidad). Muchas

soluciones utilizadas como extractantes de elementos en análisis de suelo contienen sales que desplazan los iones intercambiables y los llevan a la solución durante este proceso. Sin embargo, en el caso de los micronutrientes, sus niveles en la solución del suelo son generalmente muy bajos y las cantidades retenidas en los sitios de intercambio también son muy bajas. Por esta razón, la mayoría de los extractantes de micronutrientes contienen ácido, base, agentes complejantes o quelantes que también extraen elementos más lábiles desde los sólidos. Estos extractantes proporcionan una medida más útil de la capacidad de un suelo para suministrar micronutrientes que las soluciones con propiedades de intercambio de iones solamente (Lindsay, 1985)

Diversos investigadores emplearon diferentes métodos para evaluar la capacidad del suelo para suministrar micronutrientes vitales para el crecimiento de las plantas (García, 1997). Cuando se elige un método para analizar el suelo, es importante encontrar un extractante que cumpla con ciertos criterios. En primer lugar, debe ser capaz de extraer todas o la mayor parte de las formas disponibles de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. También es importante que la extracción sea reproducible y pueda proporcionar resultados rápidos. Además, es necesario que el extractante pueda adaptarse a las diferentes características del suelo. Aunque lo ideal sería encontrar un extractante que cumpla con todos estos criterios, en la práctica no siempre es posible (Ulloa Guitián & Abreu, 2001).

Idealmente los extractantes que se empleen en los estudios del suelo deberían: permitir la evaluación simultánea de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. La conveniencia de extraer varios elementos a la vez con un único disolvente siempre ha resultado atractiva para los análisis de laboratorio de rutina. Además, hay equipos modernos de análisis que permiten la determinación casi simultánea de múltiples elementos. Aunque, en realidad, no existen extractantes universales y probablemente nunca los habrá, aquellos que extraen múltiples nutrientes al mismo tiempo son muy útiles, siempre y cuando se garantice la calidad de los resultados en términos de información agronómica. La estrategia ideal es combinar los mejores métodos para evaluar la disponibilidad de nutrientes para las plantas con extractantes que permitan determinar la mayor cantidad de nutrientes posibles (Van Raij, 1994)

En los últimos años se utilizaron diferentes tipos de soluciones para extraer micronutrientes del suelo. Soluciones que contienen agentes quelantes, como ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) y ácido dietilen-triamino-pentacético (DTPA), que se combinan con los iones en solución para formar complejos solubles y extraer micronutrientes, en la actualidad son las más utilizadas. También hay soluciones ácidas que pueden extraer nutrientes de la

fase sólida no lábil a través de soluciones concentradas de ácidos fuertes, o extraer nutrientes de la solución del suelo y de los lugares de intercambio mediante soluciones diluidas, como lo son los reactivos Mehlich-1 y Mehlich-3 (Ulloa Guitián & Abreu, 2001).

1.4. Métodos de cuantificación de nutrientes: Espectrometrías Atómicas.

En la espectrometría atómica, se someten las muestras a altas temperaturas de vaporización. La concentración de átomos en fase de vapor se determina mediante la medición de la absorción o emisión de luz en longitudes de onda características. Esta técnica posee una alta sensibilidad y capacidad para distinguir entre diferentes elementos en muestras complejas. La espectrometría atómica es capaz de medir concentraciones de analitos en el rango de partes por millón, siendo esta la norma habitual. Sin embargo, en ocasiones, también se puede llegar a determinar concentraciones de partes por trillón (Harris, 2007)

Hay diferentes sistemas de atomización utilizados en la espectrometría atómica, pueden ser: una llama, un horno calentado eléctricamente, un plasma de radiofrecuencia o generado por microondas, en donde el analito se atomiza al someterse a altas temperaturas (Harris, 2007). En el ámbito de la investigación y análisis de muestras, las técnicas espectrométricas son comúnmente empleadas para el análisis elemental de muestras tanto orgánicas como inorgánicas. Algunas de las técnicas más utilizadas incluyen la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS), la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), la espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Martinez et al., 2022). Desde su introducción en 2012, MIP-OES ha suscitado un interés creciente. Se han realizado importantes modificaciones en el instrumento para mejorar su rendimiento analítico, que permitieron el uso del instrumento en varias aplicaciones de análisis multielemental, con resultados analíticos adecuados, por lo que se ha posicionado para convertirse en una alternativa al tradicional ICP-OES (Martinez et al., 2023). A continuación, se realizará una breve descripción de las técnicas utilizadas en el presente trabajo: FAAS y MIP-OES.

1.4.1. Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (FAAS)

El fundamento de la técnica (Figura 1), y el proceso realizado se basa en la medición de la energía radiante absorbida por el elemento de interés cuando la muestra es excitada con

radiación. Los átomos presentes en la muestra absorben la luz ultravioleta o visible (energía en forma de fotones) y realizan transiciones a niveles de energía más altos. Un detector registra las longitudes de onda de la luz transmitida a través de la muestra, y un procesador de señales analiza los cambios en la longitud de onda absorbida. Los átomos de cada elemento emiten líneas espectrales características, y estas líneas espectrales distintivas permiten identificar los elementos presentes en base a las longitudes de onda absorbidas. Por otro lado, la concentración del elemento de interés se determina utilizando la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia es proporcional a la concentración del analito bajo un conjunto de condiciones específicas. Para obtener un valor numérico de la concentración del analito de interés, se lleva a cabo una curva de calibración utilizando estándares de concentración conocida para calcular la concentración de los elementos en la muestra en base a la absorbancia medida (García & Báez, 2012).

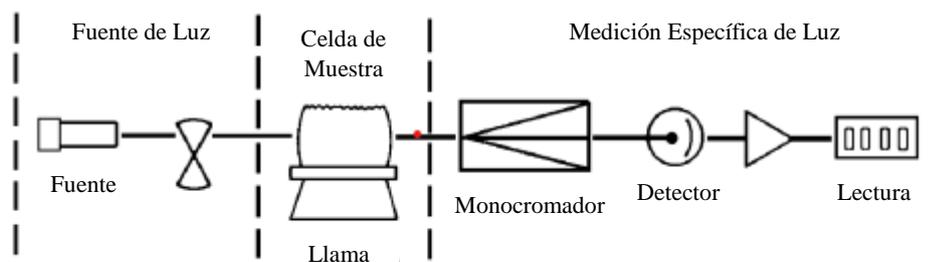


Figura 1. Instrumentación y técnica en FAAS. (Beaty & Kerber, 1993)

El principio de funcionamiento del proceso puede describirse de la siguiente manera: Para poder medir la energía absorbida y obtener espectros atómicos, los constituyentes de la muestra se deben convertir en átomos o iones gaseosos a través de un atomizador, en este trabajo se utilizó un atomizador de llama del tipo ‘Quemador de flujo laminar’ donde la solución de la muestra se nebuliza y forma un aerosol mediante la mezcla de un flujo de gases: oxidante y combustible (Figura 2). La combinación más común de gases combustible y oxidante es acetileno y aire, que produce una llama con una temperatura que oscila entre 2400 y 2700 K. Con tantos procesos complejos que ocurren en la atomización es fundamental comprender las características de las llamas y las variables que pueden influir en ellas, ya que contribuye a aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad en la espectrometría de absorción atómica (Skoog, 2007).

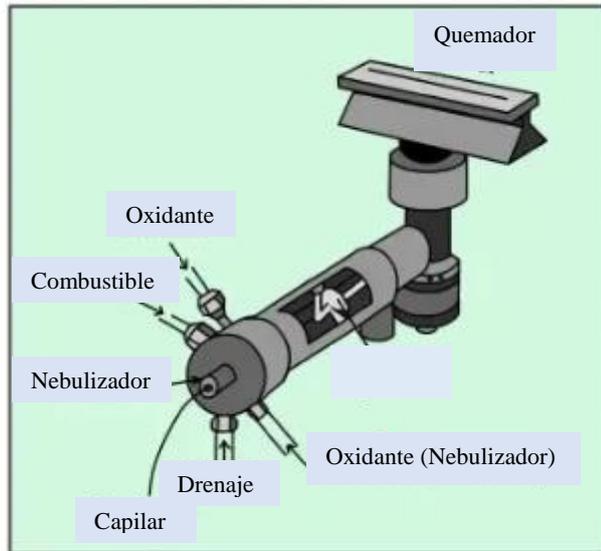


Figura 2. Esquema de atomización de premezcla. (Izario Filho et al., 2012)

La fuente de luz más utilizada en la FAAS es la lámpara de cátodo hueco (Figura 3). Este tipo de lámpara está compuesta por un ánodo y un cátodo, cuyo cátodo está formado por el elemento químico específico, del cual se necesita el espectro de emisión para la medición. Cuando se aplica una diferencia de potencial adecuada entre los electrodos, se produce la ionización del gas inerte presente dentro de la lámpara y los cationes gaseosos adquieren energía cinética suficiente para disolver algunos de los átomos metálicos de la superficie del cátodo. Estos átomos metálicos liberados se encuentran en estados excitados y, cuando regresan a su estado fundamental, emiten radiación característica propia de cada elemento. Finalmente, los átomos metálicos se difunden nuevamente hacia la superficie del cátodo o las paredes de vidrio del tubo, donde se vuelven a depositar. Este proceso de deposición completa el ciclo y permite que se mantenga un suministro continuo de átomos metálicos para su excitación (Skoog, 2007).

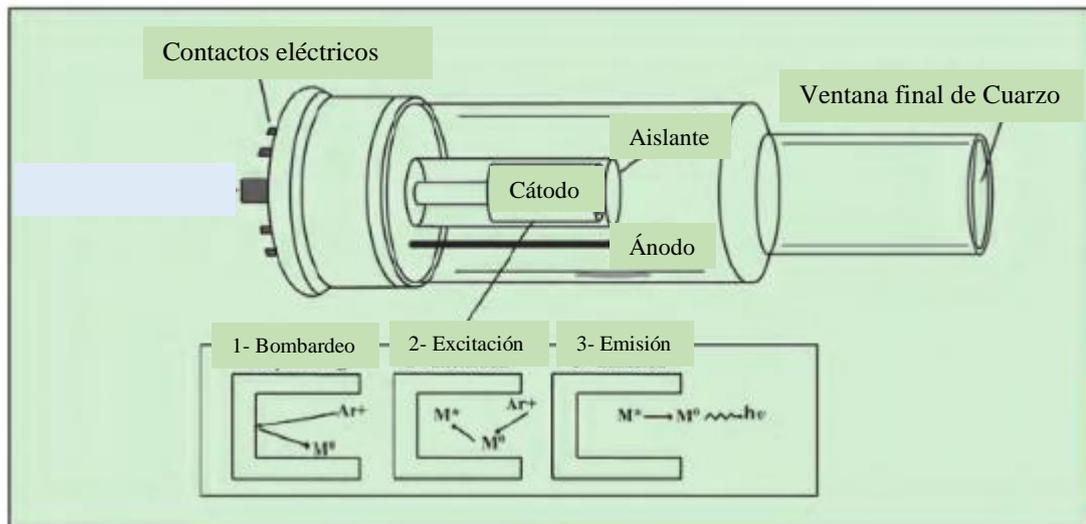


Figura 3. Esquema de la lámpara de cátodo hueco.

La naturaleza de la radiación que emite esta fuente es monocromática, es decir que produce una línea a la longitud de onda de trabajo. Cuando pasa a través de la llama, parte de la energía que emite la lámpara, es absorbida por los átomos libres generados en la llama, provocando una cierta absorbancia, que será proporcional a la concentración del elemento en la solución analizada. Por lo tanto, una desventaja importante es el requerimiento de una lámpara específica para cada elemento a analizar. Esto implica que el proceso de análisis se vuelva más lento y costoso cuando se deben determinar múltiples elementos en una misma muestra. Es necesario cambiar y ajustar las lámparas para cada elemento, lo que incrementa la complejidad y el tiempo necesario para llevar a cabo el análisis. Además, se debe disponer de una variedad de lámparas (Izario Filho et al., 2012). En algunos casos las lámparas también pueden estar compuestas por una mezcla o aleación para que puedan determinarse varios elementos sin necesidad de cambiar la lámpara (ej. Fe, Cu, Mn y Zn).

Luego de estos procesos, se comienza por medir la absorbancia de una muestra en blanco y luego se miden los estándares con concentraciones crecientes del analito. A partir de estos valores, se construye una curva analítica. Utilizando la interpolación en la curva analítica, se obtiene el valor de concentración del analito en la solución de muestra. El cálculo de la concentración de la muestra original se realiza considerando la masa o alícuota de las muestras y las respectivas diluciones en caso de que hubiese (Izario Filho et al., 2012).

1.4.2. Espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)

A diferencia de FAAS, en la espectrometría de emisión óptica (OES), aunque también la muestra se somete a altas temperaturas y provoca la disociación de esta en átomos e iones, cuando estos se encuentran en estados excitados, regresan a su estado fundamental emitiendo radiación característica para cada analito. En OES, se mide la intensidad de esta luz emitida en longitudes de onda específicas para determinar las concentraciones de los elementos presentes en la muestra.

El principio de funcionamiento está compuesto por tres componentes esenciales: la fuente de energía para generar el plasma, con un generador de energía de microondas, un dispositivo de acoplamiento para transferir la energía a la muestra, un regulador de potencia y la cavidad de microondas. Los magnetrones son la opción más común para generar las microondas necesarias (Figura 4). Se enciende mediante una descarga eléctrica y la característica más destacada de esta técnica es que se mantiene mediante un flujo de nitrógeno.

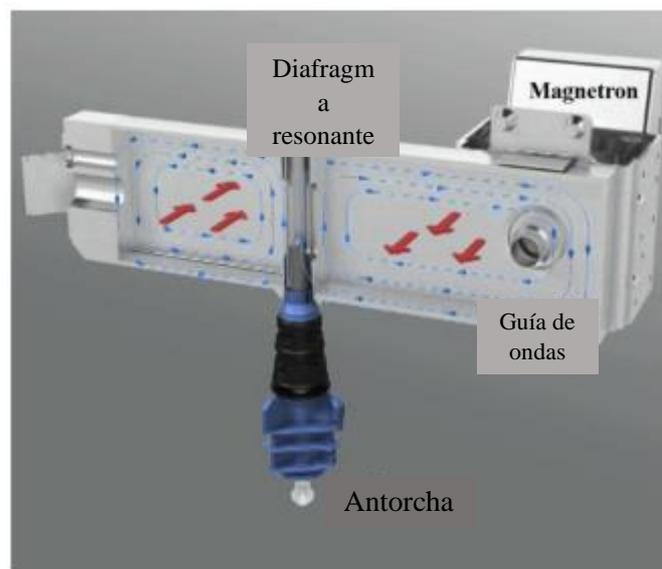


Figura 4. Representación de la abertura resonante utilizadas en MIP-OES de Agilent Technologies.

El sistema de introducción de muestra y suministro de gas de plasma, cuyo propósito es llevar la muestra líquida al plasma en condiciones óptimas para la estabilidad y generación de señales en la fuente de excitación, utiliza un nebulizador para convertir el flujo líquido en un aerosol, que luego se introduce en el plasma mediante una cámara de nebulización. En el plasma, la muestra se atomiza, y los electrones presentes en esos átomos son impulsados a

estados de mayor energía debido a la elevada temperatura y energía térmica del plasma. Cuando los electrones vuelven a su estado fundamental, el espectrómetro y el sistema electrónico, es responsable de capturar la radiación emitida, se dispersa a través de un sistema óptico y con las longitudes de onda específicas de cada elemento es posible identificar los elementos de interés que tiene características únicas para cada elemento a analizar. La intensidad de cada línea de emisión se mide en el detector y es proporcional a la concentración del elemento presente en la muestra, lo que permite cuantificarlos. (Jankowski & Reszke, 2010). Se puede observar en la Figura 5 un diagrama del sistema MIP-OES.

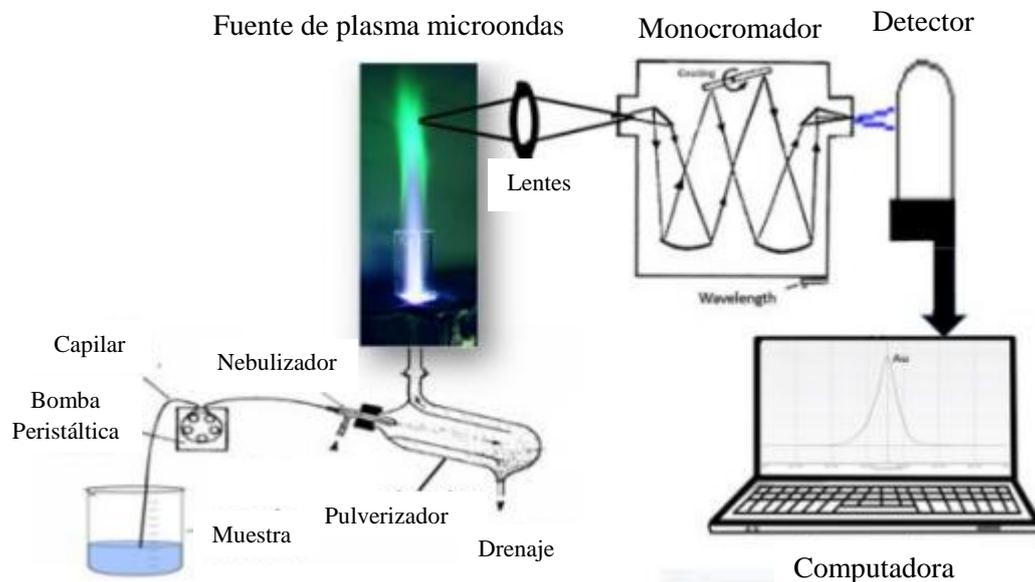


Figura 5. Diagrama del sistema MIP-OES (Balaram, 2020)

Una de las ventajas clave de la OES es que las fuentes de alta temperatura utilizadas pueden excitar múltiples niveles de energía para varios elementos simultáneamente, es decir todos los átomos y iones excitados pueden emitir su radiación característica casi al mismo tiempo. Esto permite la flexibilidad de poder seleccionar diferentes longitudes de onda de emisión para un elemento y también medir la emisión de varios elementos al mismo tiempo. Sin embargo, la desventaja asociada con esta característica es que a medida que se aumenta el número de longitudes de onda de emisión, también aumenta la probabilidad de interferencias de líneas de emisión que están muy cercanas en longitud de onda, lo que dificulta su medición separada (Gupta, 2012).

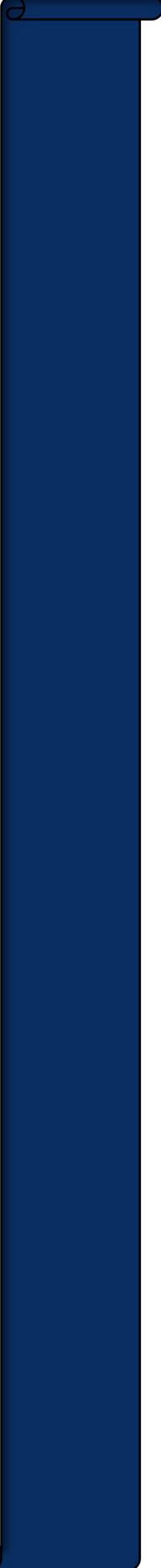
En los últimos diez años, esta técnica ha sido objeto de un enfoque particular debido a sus similitudes con ICP-OES, pero como se nombró anteriormente posee una ventaja significativa cuanto a costos operativos debido al uso de nitrógeno en lugar de argón como gas de plasma que es utilizado en ICP-OES (Serrano, 2022). También elimina la necesidad de gases peligrosos como el acetileno en la técnica FAAS, y alcanza una temperatura de operación de alrededor de 5000K (Pelizzaro et al., 2019).

1.5. Hipótesis

El prototipo de equipo propuesto en la presente tesis, 'cuba de extracción', será igual de efectivo al método convencional por agitación, centrifugación y filtración para la extracción de microelementos en las muestras de suelo.

1.6. Objetivos

- Estudiar la capacidad de extracción de micronutrientes con dos soluciones de extracción: DTPA-TEA, utilizado más frecuentemente a nivel nacional para el diagnóstico de micronutrientes en suelo, y Mehlich III, un extractante universal más utilizado a nivel internacional.
- Evaluar un prototipo para la extracción de Fe, Cu, Zn y Mn en muestras de suelo que permita disminuir los tiempos de análisis en el laboratorio.
- Comparar dos espectrometrías atómicas para la cuantificación de Fe, Cu, Zn y Mn en extractos de suelo.



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y

MÉTODOS

2.1. Muestras de suelo

Se seleccionaron 7 sitios de muestreo en la región este de La Pampa en base a diferentes manejos y/o usos: siembra convencional con pastoreo (muestra 1), siembra directa sin pastoreo (muestra 2), siembra convencional destinado a implantación de alfalfa (muestra 3) y siembra convencional lotes destinados a girasol (muestras 4 a 7).

Se tomaron muestras de suelo compuestas de 3 submuestras a los 0-20 cm de profundidad, las cuales se secaron al aire y se tamizaron a 2 mm. Además, se usó una muestra de suelo de referencia interna identificada como 13/709 durante todo el proceso analítico. Las muestras fueron caracterizadas en el laboratorio para los parámetros fósforo extractable (Bray & Kurtz, 1945), materia orgánica (Walkley & Black, 1934), pH en suspensión suelo: agua 1:2,5 y fracciones texturales (Bouyoucos, 1962). La Tabla 1 muestra los resultados de las propiedades físicas y químicas analizadas.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo.

Muestra	Fósforo	Materia orgánica	pH 1:2,5	Arcilla+Limo
	mg Kg ⁻¹	(%)		(%)
1	27,6	1,4	6,6	47,8
2	50,2	2,0	6,4	43,5
3	27,9	1,7	6,9	33,3
4	45,2	1,4	6,5	18,0
5	19,3	1,9	7,0	22,0
6	4,5	1,7	6,8	30,0
7	9,3	1,9	6,9	44,0
13/709	28,6	2,9	6,5	56,0

2.2. Instrumental

Para la determinación de Cu, Fe, Mn y Zn se utilizaron dos espectrómetros: un espectrómetro de absorción atómica con llama (FAAS) (Perkin Elmer PinAAcle 900H) y un espectrómetro de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES) (Agilent MP 4210). El FAAS equipado con software Winlab fue utilizado empleando los parámetros predeterminados en el software para todos los elementos. El tiempo de integración fue de 3 s (leído por triplicado), se utilizó un cabezal de 10 cm para llama aire-acetileno y las muestras

se introdujeron mediante auto aspiración con un nebulizador de alta sensibilidad. El MIP OES está equipado con un autosampler Agilent modelo SPS3, nebulizador Meinhard, una cámara de simple paso y un generador de nitrógeno, que es el gas que autosostiene al plasma. Además, tiene un módulo de control de gas externo que permite la inyección de aire en el plasma para evitar la deposición de carbón en la antorcha y la inestabilidad del plasma, que puede surgir del análisis de muestras orgánicas, y para reducir las emisiones de fondo. Con el patrón de calibración de máxima concentración se optimizaron los parámetros instrumentales del MIP-OES: la alineación de la antorcha, posición de visualización y la presión de nebulización para todos los elementos. Las condiciones instrumentales y parámetros de operación de ambos instrumentos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones instrumentales y parámetros de operación aplicados a la determinación de Cu, Fe, Mn y Zn en FAAS y MIP-OES.

Parámetros	Cu	Fe	Mn	Zn
	FAAS			
Longitud de onda (nm)	324,75	248,33	279,48	213,86
Ancho de slit (nm)	0,7	0,2	0,2	0,7
Llama	Aire-acetileno			
	MIP-OES			
Longitud de onda (nm)	324,7	317,9	403,0	481,0
Flujo del nebulizador (L min ⁻¹)	0,70	0,65	0,90	0,45
Presión del nebulizador (kPa)	180	200	240	240
Tiempo de toma de muestra (s)	2	3	2	2

2.3. Reactivos y soluciones

Reactivos de calidad p.a. fueron usados para preparar las dos soluciones de extracción para lo cual se utilizaron matraces de 1 L llevando a volumen con agua destilada. La solución Mehlich III fue preparada a partir de 20 g de nitrato de amonio, 0,56 g de fluoruro de amonio, 0,29 g de EDTA, 11,49 mL de ácido acético y 0,89 mL de ácido nítrico. Mientras que la solución DTPA-TEA fue preparada a partir de 15 mL de trietanolamina (TEA), 1,5 g de DTPA y 1,47 g de cloruro de calcio dihidratado, ajustando el pH a 7,3 (Sparks, 1996).

Las curvas de calibración a utilizar en FAAS se realizaron a partir de estándares de calibración certificados (NIST) 1000 mg L⁻¹ de Cu, Fe, Mn y Zn. Mientras que las curvas de calibración a utilizar en MIP-OES se prepararon a partir de un patrón multielemental (SCP SCIENCE Plasma CAL) 50 mg L⁻¹ de Cu, Mn y Zn y un patrón monoelemental (SCP SCIENCE Plasma CAL) 1000 mg L⁻¹ de Fe. Se realizaron las curvas por duplicado. Además, se preparó una solución blanco para cada recta. Todas las muestras y estándares de calibración se prepararon en las soluciones de extracción correspondientes Mehlich III o DTPA-TEA.

2.4. Métodos de extracción

2.4.1. Método convencional de agitación, centrifugación y filtración

Se siguieron métodos convencionales de agitación, centrifugación y filtración para la extracción de Cu, Fe, Mn y Zn de las muestras de suelo (Sparks, 1996). Para ello se utilizaron dos soluciones de extracción frecuentemente empleadas en la literatura: Mehlich III y DTPA-TEA. La Tabla 3 muestra las variables de la etapa de agitación con cada solución de extracción. Luego de la etapa de agitación las muestras se centrifugaron durante 5 min y el sobrenadante obtenido se filtró con papel de filtro tipo Whatman N.º 42, recogiendo el filtrado en un matraz volumétrico de 50 mL. Los extractos se reservaron para la posterior cuantificación de los elementos de interés por FAAS y MIP-OES.

Tabla 3. Variables definidas en la etapa de extracción de los elementos con las dos soluciones de extracción estudiadas.

Variable	Solución de extracción	
	Mehlich III	DTPA-TEA
Masa de suelo (g)	2	10
Volumen de solución (mL)	20	20
Suelo (g) : solución (mL)	1:10	1:2
Tiempo de agitación (min)	5	120
Velocidad de agitación (rpm)	120	120

2.4.2. Método de extracción propuesto: cuba de extracción

La extracción de los elementos Cu, Fe, Mn y Zn con solución de extracción DTPA-TEA también se realizó empleando un prototipo de equipo al cual se denominó cuba de extracción (Kloster et al. 2019). La cuba de extracción consiste en un colector rectangular de acrílico con una tapa perforada con 24 posiciones de manera que se puedan analizar esta cantidad de muestras de suelo en simultáneo o solo trabajar con las posiciones necesarias. Sobre la tapa, en cada perforación se colocan las jeringas en las cuales se realiza la extracción de los elementos de interés del suelo utilizando una solución de extracción, mediante percolación. Estas jeringas se preparan previo a su uso con un sistema de filtro que consiste en pieza de plástico + filtro de papel tipo Whatman N° 42 + pieza de plástico. En el interior de la cuba hay una gradilla con 24 posiciones para tubos aforados de 50 mL sobre los cuales se recoge la solución procedente de la extracción y una salida de flujo para conectar a una bomba de vacío. Además, entre la tapa y el colector se ubica una banda de goma para garantizar la efectividad del vacío (Figura 6).

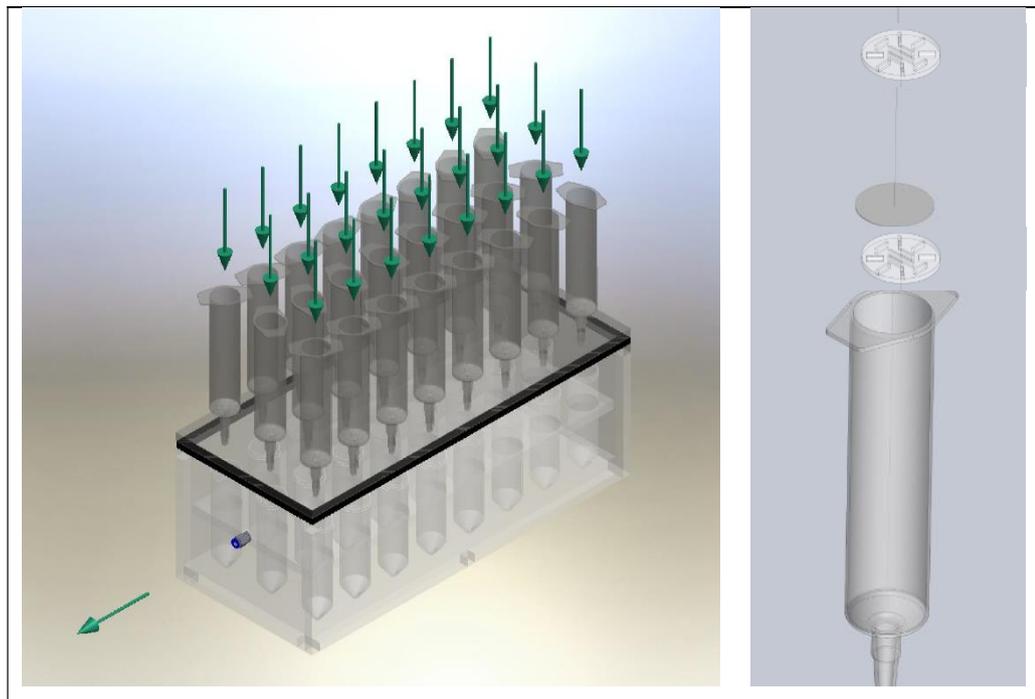




Figura 6. Esquema de la cuba de extracción propuesta para realizar la extracción de Cu, Fe, Mn y Zn e imagen ampliada del sistema de filtro de las jeringas (arriba) y foto de la cuba de extracción (abajo) (Kloster et al. 2019).

El desempeño de la cuba de extracción se evaluó, para definir sus condiciones óptimas de funcionamiento, estudiando dos variables: alícuota de solución de extracción y tiempo de extracción. La alícuota de solución de extracción consistió en añadir el volumen total de solución (20 mL) al comienzo de la etapa de extracción, o en dos alícuotas de 10 mL, con intervalo de 1 h entre ambas. El tiempo de extracción se evaluó en 2 h, que es el tiempo propuesto en la literatura para el método clásico de extracción con DTPA-TEA, o 1 h, para estudiar la posibilidad de disminuir el tiempo involucrado en esta etapa. Al finalizar el tiempo de extracción se aplicó vacío para obtener el máximo volumen de extracto. Para todos los ensayos de optimización se utilizó el material de referencia interno (muestra 13/709) analizado por sextuplicado.

2.5. Parámetros analíticos de validación

Las cifras de mérito del método de extracción se identifican con el propósito de calificar un método determinado y sus propiedades analíticas con otros (Curie, 1995; Olivieri, 2012). En este trabajo las cifras de mérito se seleccionaron en base a las que se suelen adoptar en química analítica para asegurar la confiabilidad de los resultados, y son: veracidad, precisión, linealidad, rango de trabajo, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

La veracidad de un procedimiento analítico expresa la proximidad de la concordancia entre el valor de medición encontrado y el que se acepta como valor convencional o conocido

(Mocak et al 1997). En este trabajo la veracidad de los resultados obtenidos con el uso de la cuba de extracción se evaluó utilizando el material de referencia interno (muestra 13/709), mientras que la veracidad del método de cuantificación MIP-OES, como método alternativo a FAAS para la cuantificación de los elementos en suelo, se determinó por comparación de los resultados obtenidos con FAAS (Eurolab, 2016). La precisión retrata la cercanía de un conjunto de medidas independientes obtenidas a partir de un procedimiento experimental y se asocia sólo a la dispersión y no a la desviación de un valor correcto o de referencia (Mocak, et al. 1997). En este trabajo se evaluó la precisión a partir del coeficiente de variación de las medidas replicadas en un mismo día (repetitividad) y en diferentes días (precisión intermedia). La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados experimentales, que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (Mocak, et al 1997; Olivieri, 2014). Se debe evaluar una relación lineal en todo el rango del procedimiento analítico, este grado de interrelación entre dos concentraciones cuantificadas se indica mediante el coeficiente de correlación lineal (R^2), que expresa qué tan cerca están linealmente relacionadas estas dos variables. Es un parámetro relevante al comparar diferentes métodos empleados en un rango de trabajo similar. Sin embargo, la sensibilidad de calibración, que es igual a la pendiente de la recta de calibrado, no es adecuada para comparar métodos analíticos que se basan en respuestas de diferente naturaleza (FAAS y MIP-OES). Para ello, es adecuado utilizar la sensibilidad analítica, definida por la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental y se estima el ruido instrumental a través de los desvíos de las réplicas de las mediciones de calibrado respecto de sus promedios (Fragoso et al 2016; Olivieri 2014). El LOD es la mínima concentración del analito que se puede distinguir de una solución blanco. Mientras que el LOQ representa la concentración más baja que puede medirse cuantitativamente mediante un método. Los criterios de aceptación para estos dos parámetros se obtuvieron con base en las definiciones de IUPAC/ACS (Mocak, et al 1997). El rango de trabajo es el intervalo de concentración especificado en el que se puede determinar un analito dentro de un grado adecuado de exactitud y precisión (Mocak, et al 1997). Se estableció como el intervalo entre el LOQ, estimado para la curva analítica, y la solución estándar de mayor concentración de la curva de calibración.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de diferentes soluciones de extracción: DTPA-TEA y Mehlich III

La evaluación de las soluciones de extracción de los micronutrientes se realizó empleando el método convencional de agitación, centrifugación y filtración, empleando FAAS. Se puede observar que Mehlich III tuvo una mayor capacidad de extracción que DTPA-TEA en la extracción de todos los elementos estudiados (Figura 7). En cuanto a Fe se observa una gran diferencia (mayor al 80 %) en la extracción del elemento con Mehlich III que con DTPA-TEA. En los elementos Cu, Zn y Mn también hay diferencias en la cantidad extraída con Mehlich III, que aproximadamente duplica la cantidad extraída con DTPA-TEA. Se puede concluir que Mehlich III fue más eficiente que el DTPA-TEA.

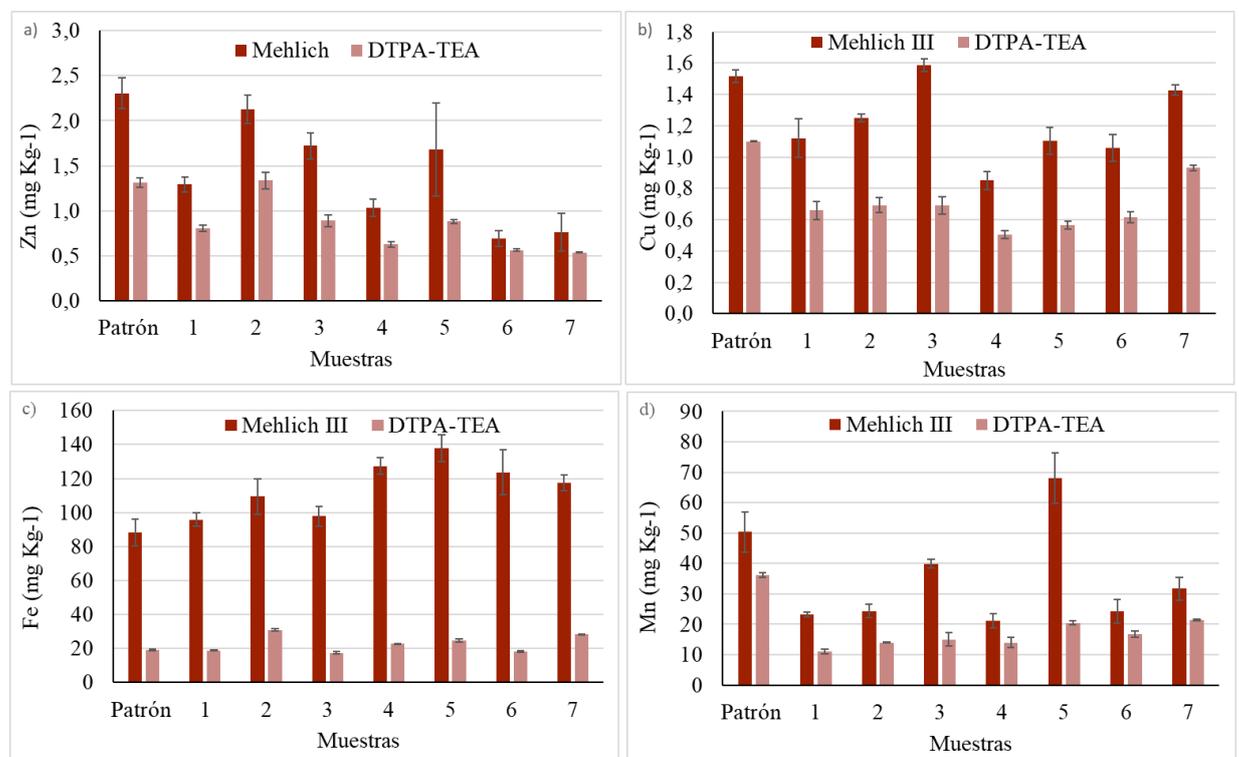


Figura 7. Contenido de elementos Zn (a), Cu (b), Fe (c) y Mn (d) en las muestras de suelo obtenido mediante el uso de extractante Mehlich III y DTPA-TEA.

Es importante observar cómo otros estudios también han evidenciado el buen desempeño del extractante Mehlich III en el análisis de extracciones de microelementos en el suelo. En el trabajo de Gannini-Kurina et al. (2021), se evaluaron las soluciones extractoras Mehlich III y DTPA-TEA en muestras de suelo del territorio de Córdoba, y se encontró que los coeficientes de correlación entre las extracciones realizadas con ambas soluciones de

extracción fueron positivos, lo que sugiere una cierta concordancia entre los métodos. Sin embargo, al analizar el conjunto de suelos estudiados, se concluyó que la extracción con Mehlich III fue mayor que la obtenida con DTPA-TEA. Particularmente, los elementos Fe y Mn mostraron concentraciones mayores cuando se utilizó el método Mehlich III en comparación con el agente DTPA-TEA. Por otro lado, en el caso de los elementos Cu y Zn, ambos métodos apenas difirieron en sus resultados, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, en el estudio de García et al. (1997) en el cual se compararon diversas soluciones como, Mehlich III, EDTA (pH=8,2) y DTPA-TEA en la determinación de la biodisponibilidad de Cu, Zn, Mn y Fe en suelos argentinos, los valores obtenidos también mostraron que Mehlich III extrae cantidades mayores de Cu, Zn, Mn y Fe de diferentes fracciones en el suelo en comparación con las otras soluciones. Aunque DTPA-TEA también tuvo un buen desempeño.

Los resultados obtenidos en otro trabajo realizado por Roca-Fernández & Paz-González (2008) han revelado otro comportamiento de los extractantes utilizados en este estudio. Estos autores realizaron extracciones de Fe, Mn, Cu y Zn en suelos tratados con y sin compost, empleando las soluciones DTPA-TEA y Mehlich III. Los datos muestran que, en los suelos sin compost DTPA-TEA resultó en valores medios más altos para Fe, Mn, Cu y Zn, mientras que, en los suelos con compost, Mehlich III extrajo contenidos más elevados de estos elementos en comparación con DTPA-TEA. Este comportamiento diferencial de los dos extractantes fue un resultado inesperado, con la conclusión de que, en el conjunto de muestras, la solución Mehlich III extrae más Fe y Mn, pero menos Zn y Cu que el agente DTPA-TEA. Roca-Fernandez & Paz-González (2008) atribuyen estos resultados a interacciones entre la capacidad de los agentes extractantes y las propiedades del suelo. El agente DTPA-TEA tiene una mejor capacidad para solubilizar nutrientes en suelos con pH cercano a la neutralidad, mientras que Mehlich III es más adecuado en suelos ácidos. Dado que los suelos estudiados tenían un amplio rango de valores de pH, esto pudo haber influenciado los resultados obtenidos en el trabajo. Estas relaciones de la capacidad de extracción de las soluciones con el pH del suelo también fueron mencionadas por Gannini-Kurina et al. (2021) quienes obtuvieron las diferencias más amplias de Mehlich III por sobre DTPA-TEA en suelos con pH más alto. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este trabajo, donde se pudo observar que Mehlich III extrajo mayor contenido de microelementos que DTPA-TEA, y en ciertas muestras, la solución de extracción Mehlich III extrajo aproximadamente el doble de Cu y Zn que el agente DTPA-TEA.

En general se admite que la solución Mehlich III extrae en promedio mayores contenidos de estos cuatro elementos, Fe, Cu, Mn y Zn debido al hecho de que es una solución que contiene compuestos de naturaleza ácida, así como el quelato, EDTA, por lo que debería ser capaz de solubilizar una mayor cantidad tanto de macronutrientes como de micronutrientes (Roca-Fernández & Paz-González, 2008)

3.2. Evaluación de la cuba como método de extracción

La evaluación de la cuba como método de extracción se realizó utilizando la solución de extracción DTPA-TEA. Se definieron las mejores condiciones de operación teniendo en cuenta dos variables: N° de alícuotas de solución de extracción y tiempo de extracción. Los resultados de optimización indican que la extracción más eficiente de los elementos de interés se obtiene al realizar el procedimiento con dos alícuotas de 10 mL de solución de extracción, un intervalo de 1 h entre cada adición de solución (tiempo de extracción total 2 h) y aplicación de vacío al finalizar el tiempo de extracción (Tabla 4). Esto se corresponde con los ensayos de laboratorio, donde se observó que la solución filtra rápidamente una vez que se agrega a la jeringa, disminuyendo los procesos de intercambio de iones que dependen del tiempo de contacto entre el suelo y la solución de extracción. Es por ello que resulta necesario extender el tiempo de contacto de la solución de extracción con el suelo, de forma tal que transcurran 2 h, para obtener la mayor concentración de los elementos en el extracto.

Tabla 4. Resultados de análisis para Cu, Fe, Mn y Zn en el estudio de optimización de la cuba de extracción relativo a las variables alícuota de solución de extracción y tiempo de extracción. En cursiva se señalan las variables óptimas para obtener la mayor recuperación de los elementos.

Variable		Cu	Fe	Mn	Zn
N° alícuotas	Tiempo de extracción (h)	(mg Kg ⁻¹)			
1	2	0,53	6,5	37,2	1,17
1	1	0,45	5,0	29,6	1,03
2	2	<i>1,07</i>	<i>18,9</i>	<i>43,6</i>	<i>1,97</i>

Una vez optimizado el funcionamiento de la cuba de extracción, se procedió a evaluar los parámetros exactitud y precisión con el material de referencia interno (13/709). La exactitud se evaluó a partir del cálculo de recuperación (Recuperación (%) = valor obtenido con la

cuba * 100 / valor de referencia interno). La recuperación fue aceptable para los elementos Cu, Zn y Fe (80 % < recuperación < 120 %). Mientras que no fue aceptable para Mn (recuperación > 120 %). La precisión se evaluó calculando el coeficiente de variación (CV) de muestras analizadas en el mismo día (repetitividad) y en distintos días (precisión intermedia) (Tabla 5). Las condiciones de repetitividad incluyeron seis réplicas independientes en un mismo día, mientras que las condiciones de precisión intermedia se obtuvieron mediante tres réplicas independientes en tres días diferentes de análisis. La precisión de los resultados obtenidos empleando la cuba de extracción fue aceptable tanto en condiciones de repetitividad como de precisión intermedia (CV < 20 %) (Marbán & Ratto, 2005).

Tabla 5. Parámetros de validación obtenidos a partir de material de referencia interno.

	Exactitud (%)		Precisión (%)
	<i>Recuperación</i>	<i>Repetitividad</i>	<i>Precisión intermedia</i>
Cu	104,7	7,5	11,5
Zn	123,4	14,1	13,6
Fe	117,4	9,7	19,8
Mn	157,9	2,0	21,0

En la Figura 8 se puede observar la comparación de los resultados obtenidos con la cuba de extracción y con el método convencional de agitación, centrifugación y filtración, empleando la solución de extracción DTPA-TEA y las muestras de suelo 1 a 7. Al interpretar los resultados obtenidos, podemos observar que para Zn y Cu no se muestran diferencias significativas entre los métodos de extracción. Mientras que los resultados obtenidos para Fe y Mn presentan algunas diferencias significativas dependiendo de la muestra de suelo. La cuba de extracción tuvo un mayor desempeño en la extracción de Fe y Mn en las muestras 1, 2 y 6.

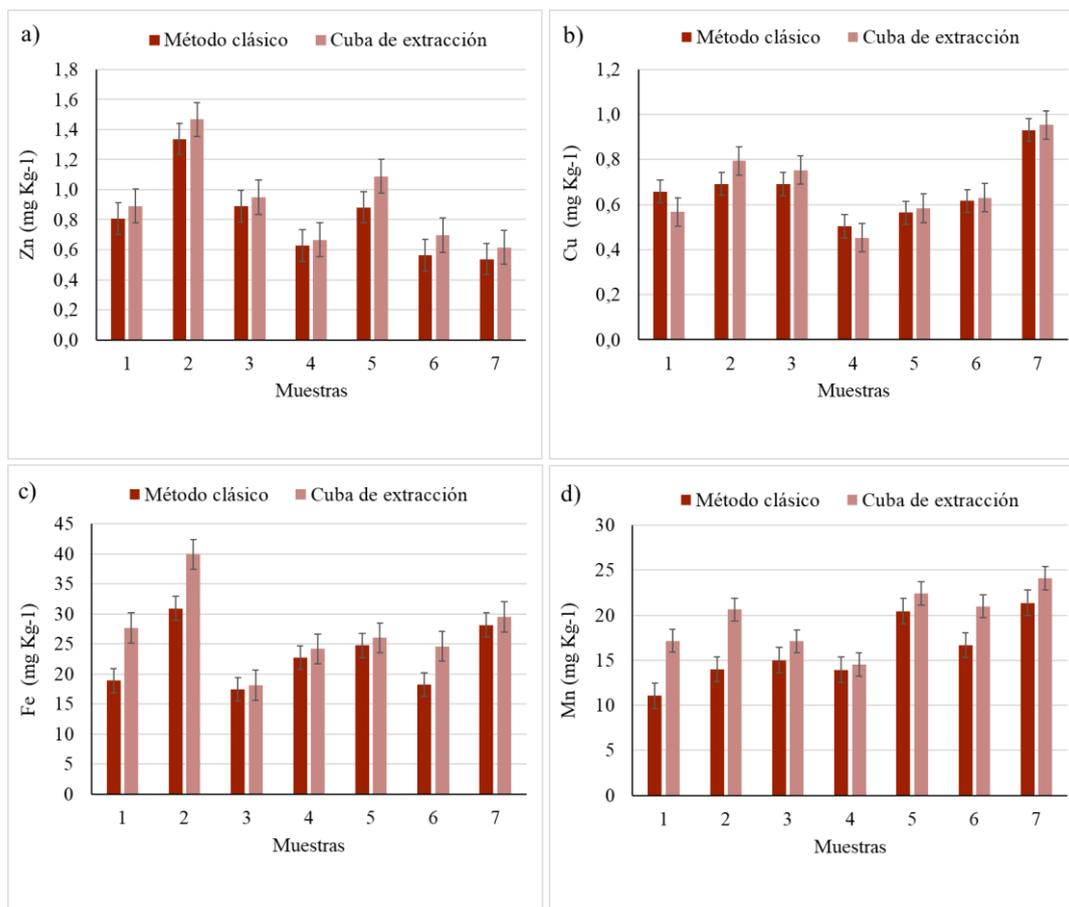


Figura 8. Concentración de elementos Zn (a), Cu (b), Fe (c) y Mn (d) en las muestras de suelo obtenido mediante el uso del método clásico y de la cuba de extracción.

En la búsqueda de trabajos relacionados con la determinación de elementos mediante un procedimiento de extracción de un solo paso y cuantificación con FAAS, la información se limita al trabajo de Kloster et al (2019). Estos autores realizaron la extracción de cationes intercambiables Ca, Mg, Na y K y capacidad de intercambio catiónico a una variedad de suelos de La Pampa, Argentina, utilizando la cuba de extracción, que luego fueron comparados con los valores experimentales obtenidos por el método clásico de agitación, centrifugación y filtración. En dicho trabajo se estudiaron parámetros de funcionamiento del sistema, en donde las variables fueron: disposición del sistema de filtración, relación de alícuotas: volumen de la solución extractora y vacío, para luego poder obtener un extracto de la muestra y cuantificarla por FAAS. Para poder darle veracidad al proceso Kloster et al (2019), lo evaluaron utilizando un material de referencia interno y muestras de interlaboratorios con valores asignados y obtuvieron porcentajes de recuperación dentro de los criterios aceptados. Por lo que concluyeron que el método de extracción con la cuba de extracción es una opción efectiva para reemplazar el método clásico en la extracción de

cationes intercambiables y capacidad de intercambio catiónico en suelos. A pesar de las diferencias de extracción, atribuidas a que estos procesos necesitan tiempos y soluciones de extracción diversas, al interpretar los resultados de Kloster et al (2019) y el trabajo presentado se puede reflejar la simplicidad, rapidez y capacidad para procesar hasta 24 muestras al mismo tiempo. Además de que este método reduce significativamente la necesidad de suministros e instrumentos de laboratorio para las etapas de extracción, tal como agitador tipo vaivén, centrifugas, matraces aforados, embudos.

3.3. Evaluación de métodos de cuantificación: FAAS y MIP-OES

Durante esta evaluación, se llevó a cabo una comparación entre las técnicas instrumentales propuestas para la cuantificación de los elementos analizados con los extractantes Mehlich III y DTPA-TEA. Se determinaron varios parámetros de validación para FAAS y MIP-OES en la cuantificación de Zn, Cu, Fe y Mn, entre ellos, límites de cuantificación y de detección, sensibilidad y sensibilidad analítica, rangos de trabajo de cada equipo y coeficientes de determinación (Tabla 6). La sensibilidad analítica se define como la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la concentración del elemento analizado. Es un parámetro relevante para comparar estos dos métodos instrumentales ya que ambos generan señales distintas en el mismo rango de concentraciones. De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 6, se observa que la sensibilidad analítica empleando la técnica FAAS es mayor que la de MIP-OES para todos los elementos estudiados. Ambas técnicas instrumentales cumplen con los criterios de aceptación establecidos para el parámetro de linealidad ($R^2 > 0.99$). Además, en todos los casos analizados, la técnica FAAS demostró tener una mejor capacidad para detectar (LOD) y cuantificar (LOQ) los elementos estudiados en comparación con la técnica MIP-OES, aunque los parámetros calculados están en el mismo orden de magnitud entre ambas espectrometrías. El rango de trabajo es similar para los elementos Cu y Zn. Mientras que para los elementos Fe y Mn MIP-OES arroja un rango de medición más amplio, lo cual es una de las ventajas de este tipo de espectrometría.

Tabla 6. Cifras de mérito obtenidas a partir de cada espectrometría para los elementos estudiados utilizando el prototipo de extracción y la solución DTPA-TEA.

	Analito	Pendiente	Intercept y	R ²	Sensibilidad		LOD (mg Kg ⁻¹)	LOQ (mg Kg ⁻¹)	Rango (mg Kg ⁻¹)	
					Analítica	LOD (mg L ⁻¹)				
FAAS	<i>Cu</i>	0,082	0,001	1,000	77,5	0,03	0,09	0,06	0,18	0,18-4,00
	<i>Zn</i>	0,288	0,005	0,999	79,0	0,03	0,10	0,06	0,19	0,19-2,00
	<i>Fe</i>	0,051	0,009	0,998	10,2	0,17	0,52	0,34	1,03	1,03-12,0
	<i>Mn</i>	0,096	0,002	0,999	55,1	0,05	0,14	0,09	0,28	0,28-4,00
MIP- OES	<i>Cu</i>	65126,0	1397,0	0,995	21,3	0,07	0,20	0,13	0,40	0,40-4,00
	<i>Zn</i>	311,3	1,4	0,994	19,6	0,05	0,14	0,09	0,28	0,28-2,00
	<i>Fe</i>	6255,7	-1604,0	0,995	0,9	0,26	0,78	0,51	1,55	1,55-300
	<i>Mn</i>	29200,3	257,2	0,996	23,3	0,06	0,17	0,11	0,34	0,34-40,0

Los resultados encontrados son de gran importancia debido a que difieren de los hallados en la literatura existente. Uno de los trabajos encontrados Niedzielski, et al. (2015), en donde se empleó MIP-OES para analizar la composición elemental de muestras geológicas, obtuvieron límites de detección y cuantificación más bajos, alrededor de un orden de magnitud menor, para los elementos estudiados en comparación con los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, en el trabajo de Wei Li (2013) se examinaron alimentos para animales y fertilizantes utilizando MIP-OES y se compararon los resultados con los obtenidos mediante la técnica FAAS. Encontraron que MIP-OES demostró un buen desempeño con límites de detección y cuantificación notablemente más bajos para Cu, Zn, Fe y Mn, en comparación con los obtenidos en este trabajo, aun considerando las diferentes matrices analizadas. A diferencia de ello, los límites de detección y cuantificación obtenidos por Wei Li (2013) con FAAS (Cu=0,013; Zn= 0,041; Fe=0,025; Mn= 0,024 mg L⁻¹) son del mismo orden de magnitud que los obtenidos en el presente trabajo con excepción del Fe. En el estudio de Teodoro et al. (2013) se analizó el contenido de metales en muestras de suelo (incluidos Cu, Zn, Fe y Mn) utilizando como solución extractora DTPA-TEA y cuantificando con MIP-OES y FAAS. Entre los resultados, obtuvieron valores más bajos de límites de detección y cuantificación en MIP-OES que en FAAS, a excepción del Zn, a pesar de similitudes en el procedimiento en relación con lo realizado en el presente trabajo.

La veracidad de los resultados obtenidos por MIP-OES se evaluó por comparación de métodos con FAAS, un método que se utiliza de manera rutinaria en los laboratorios de suelo, a partir del coeficiente de correlación (R^2). Si cada muestra arroja un resultado idéntico por ambas espectrometrías, la línea de regresión tendría una ordenada al origen igual a 0 y una pendiente y coeficiente de correlación igual a 1. En la Figura 9, puede observarse que para los elementos Cu, Zn y Mn los resultados obtenidos muestran una correlación significativa cuando se utiliza el extractante Mehlich III (en general $R^2 > 0.80$). En cuanto a Mn los resultados de correlación entre técnicas instrumentales se aproximan a la recta ideal ($y=x$) ($R^2=0,91$), indicando que los resultados obtenidos por MIP-OES y FAAS son equivalentes. Para Cu y Zn se observa más bien resultados paralelos a la recta ideal ($y=x$) con un coeficiente $R^2= 0,87$, indicando que los resultados obtenidos por MIP-OES son sensiblemente superiores a los obtenidos mediante FAAS. En el caso de Fe los resultados muestran una relación aproximadamente lineal entre las dos técnicas instrumentales ($R^2= 0,67$ respectivamente). Se requiere llevar a cabo investigaciones adicionales con el fin de validar la relación lineal entre las técnicas o analizar los factores que contribuyen a la

variabilidad en los resultados de los análisis de Cu, Zn y Fe extraíbles con Mehlich III en suelos.

En la Figura 10 se muestra la correspondencia entre espectrometrías con extractante DTPA-TEA. Se observa que para Mn los resultados obtenidos muestran una correlación muy próxima a la recta ideal ($y=x$) cuando se utiliza este extractante ($R^2=0,97$). Los datos obtenidos mediante MIP-OES y FAAS muestran una concordancia notable, lo que indica su equivalencia en términos analíticos. De igual manera para los elementos Cu y Zn, ($R^2= 0,94$), por lo que los resultados señalan que las técnicas analíticas son comparables. Aunque, para Zn, se puede observar que FAAS es ligeramente más sensible que MIP-OES. En el caso de Fe se observa al igual que con el extractante Mehlich III una dispersión que podría requerir futuros análisis que fundamenten los valores obtenidos.

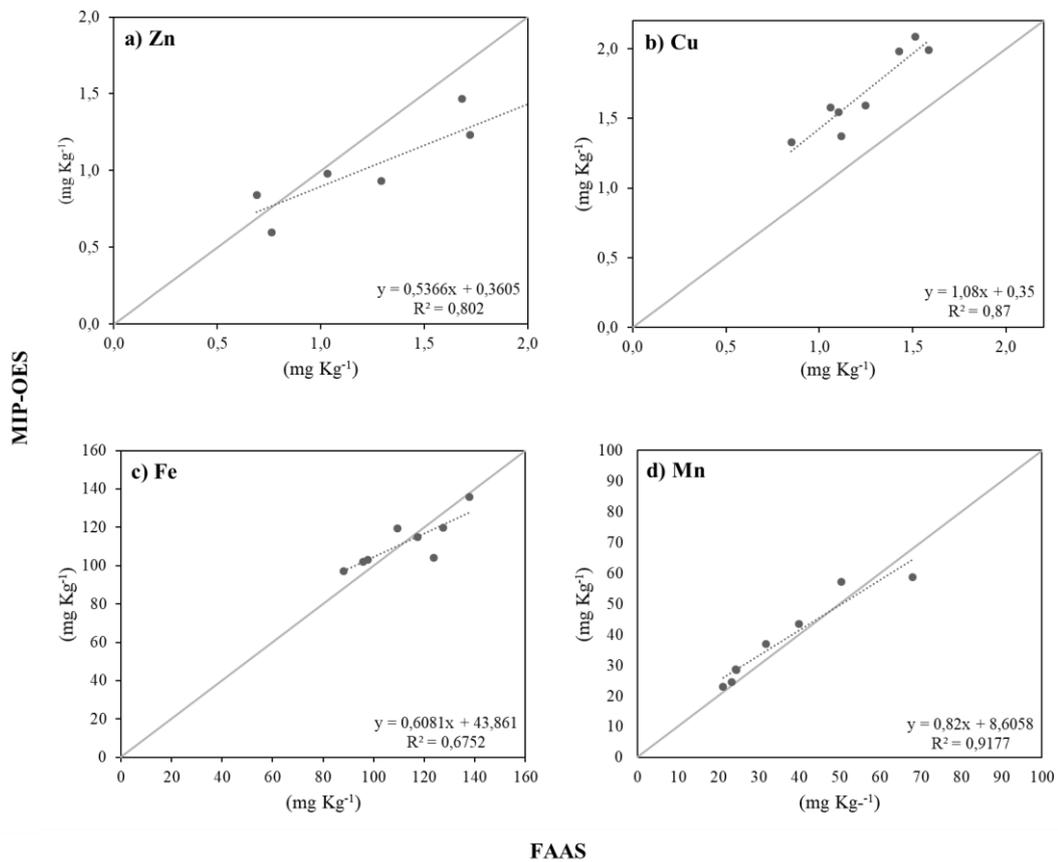


Figura 9. Correspondencia entre espectrometrías MIP-OES y FAAS para la cuantificación de Cu (a), Zn (b), Fe (c) y Mn (d) en extractante Mehlich III. La línea indica la recta $y=x$.

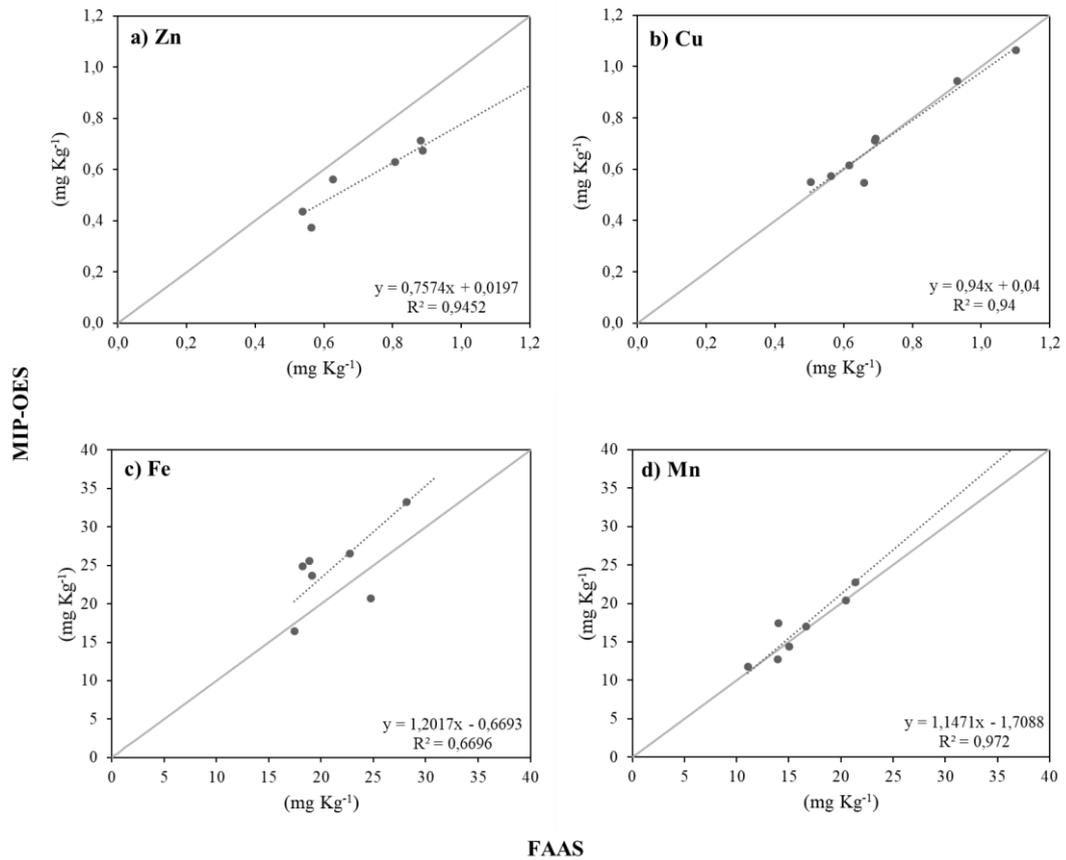


Figura 10. Correspondencia entre espectrometrías MIP-OES y FAAS para la cuantificación de Zn (a), Cu (b), Fe (c) y Mn (d) en extractante DTPA-TEA. La línea indica la recta $y=x$.

Basado en el buen desempeño de FAAS y MIP-OES obtenido del protocolo de validación propuesto, ambos métodos instrumentales podrían usarse indistintamente. En cuanto a simplicidad, rapidez, rango lineal y simultaneidad en la determinación de elementos, MIP-OES podría ser el método de elección. MIP-OES es una alternativa eficiente a FAAS. Además, la ventaja atractiva y notable de MIP-OES frente a FAAS son los bajos costos de funcionamiento, ya que no utiliza gases inflamables ni tóxicos, y el plasma se genera con nitrógeno.

3.4. Aplicación analítica a suelos pampeanos

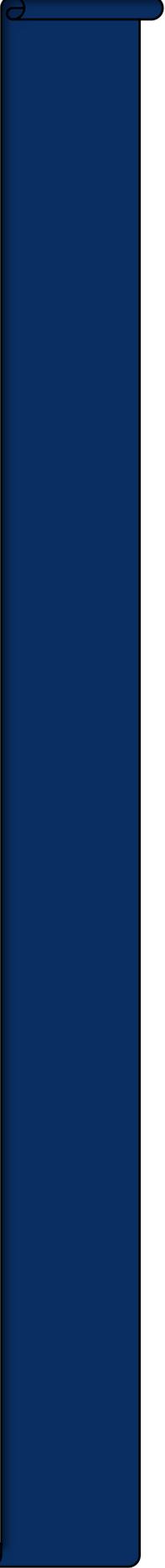
En la tabla 7 se muestran los resultados de concentración (promedio y desvío estándar) de los micronutrientes Zn, Cu, Fe y Mn, obtenidos en las muestras de suelo estudiadas correspondientes a los 7 sitios de la región este de La Pampa, con diferentes manejos y/o

usos. Las concentraciones de estos micronutrientes extractables se obtuvieron con DTPA-TEA aplicando la cuba de extracción y la cuantificación con el equipo FAAS, y evidencian valores que están dentro del rango que se ha observado en suelos de regiones áridas alrededor de todo el mundo (Moreno-Jiménez, et al., 2019). Para hacer sugerencias sobre la fertilización, es necesario contar con un valor crítico que señale cuándo el elemento empieza a limitar el crecimiento de las plantas (Ratto, 2006). Se observa que la concentración de Zn en el suelo está por debajo de la concentración crítica definida para maíz ($0,9 \text{ mg Kg}^{-1}$), es decir que tienen un nivel de Zn por debajo del cual el cultivo respondería a la fertilización (Barbieri, et al., 2017). A excepción de la muestra 7 que se sitúa en el límite de la concentración crítica.

Tabla 7. Resultados obtenidos de los micronutrientes analizados en las 7 muestras de suelo de la región Semiárida Pampeana.

Muestra	Zn			Cu			Fe			Mn		
	mg Kg ⁻¹											
1	0,57	±	0,02	0,89	±	0,03	27,71	±	0,85	17,16	±	0,52
2	0,79	±	0,02	1,47	±	0,01	39,92	±	0,47	20,62	±	0,20
3	0,75	±	0,03	0,95	±	0,02	18,18	±	0,49	17,10	±	0,18
4	0,45	±	0,02	0,67	±	0,00	24,18	±	2,84	14,53	±	1,89
5	0,58	±	0,03	1,09	±	0,03	26,02	±	0,36	22,43	±	0,25
6	0,63	±	0,01	0,70	±	0,03	24,62	±	0,69	20,98	±	0,07
7	0,95	±	0,05	0,62	±	0,02	29,47	±	3,78	24,11	±	0,26

En el caso de Cu y Fe, parecen no presentar limitantes para el desarrollo de los cultivos en general, de acuerdo con los valores críticos sugeridos en la literatura (Cu= 0,2 y Fe= 4 mg Kg⁻¹) (Lindsay & Norvell, 1978). No se encontraron valores límites significativos para Mn en la literatura consultada, y en las muestras analizadas se detectaron niveles relativos altos de este elemento. La concentración de Mn que puede ser extraído es aproximadamente comparable con la obtenida para Fe, lo que se corresponde con sus propiedades químicas similares en suelos, considerando su estado de oxidación predominante (Mn³⁺), así como la influencia del pH y las condiciones de reducción-oxidación en las diferentes formas químicas que puede adoptar.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN

4.1. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye que:

1. El método de extracción Mehlich III tiene un mejor rendimiento en la extracción de los elementos Cu, Fe, Mn y Zn en suelo en comparación con el método DTPA-TEA. Dado que Mehlich III es una solución extractiva universal, podría ser usada para la extracción de otros nutrientes en simultáneo. Sin embargo, su uso está supeditado a la disponibilidad de calibraciones a campo con el extractante Mehlich III, que definan el valor crítico para cada elemento.
2. El prototipo de equipo propuesto para la extracción de los micronutrientes en suelos, demostró ser efectivo y preciso para los elementos Cu, Fe y Zn en comparación con el método clásico que involucra agitación, centrifugación y filtración. Permite la extracción simultánea de micronutrientes en hasta 24 muestras y haciendo el análisis más simple y rápido, en cuanto a los tiempos en el laboratorio. Se recomiendan dos alícuotas de 10 ml de solución de extracción con un intervalo de 1 h entre cada adición de solución, un tiempo de extracción total de 2 h y unos segundos de vacío entre adiciones para lograr la mejor recuperación. El prototipo propuesto es un método que puede reemplazar efectivamente el método clásico para la extracción de micronutrientes en suelos con DTPA-TEA. Más estudios son necesarios para definir su aplicación a la extracción de Mn.
3. Ambos métodos instrumentales, FAAS y MIP-OES, podrían utilizarse indistintamente para la cuantificación de Zn, Cu y Mn. Mientras que más estudios son necesarios para evaluar la veracidad de MIP-OES en la cuantificación de Fe. MIP-OES es más conveniente debido a su simplicidad, rapidez y simultaneidad. También es ventajoso porque tiene un rango dinámico lineal amplio, lo que evita la necesidad de diluir las muestras. Aunque la característica más sobresaliente y atractiva de MIP OES con respecto a FAAS es el bajo costo de operación para su funcionamiento. Esto se debe a que no requiere el uso de gases inflamables ni tóxicos, y el plasma se origina mediante nitrógeno mayoritariamente obtenido del aire mediante un generador especializado. Debido a las ventajas de MIP-OES, resulta viable sugerir que pueda ser el método analítico de elección para el análisis de Zn, Cu y Mn en suelo.

Bibliografía

- Álvarez, R. B. G. (2015). Sojización y productividad de los suelos pampeanos. *Facultad de Agronomía, UBA*, Vol 24.
- Balaram, V. (2020). Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry (MP-AES) and its Applications – A Critical Review. *Microchemical Journal* .
- Barbieri, P. A., Sainz Rozas, H. R., Wyngaard, N., Eyherabide, M., Reussi Calvo, N. I., Salvagotti, F., & Echeverría, H. E. (2017). Can Edaphic Variables Improve DTPA-Based Zinc Diagnosis in Corn? . *Soil Science Society of America Journal*, 556.
- Beatty, R. D., & Kerber, J. D. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Spectrophotometry. Second Edition*. United States of America: The Perkin-Elmer Corporation.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59, 39-455. doi:10.1097/00010694-194501000-00006.
- Curie, L. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). . *Pure and Applied Chemistry*, Vol 67.
- Eurolab España. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos, una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1º Edición. www.eurachem.org.
- Fontanetto, H., & Bianchini, A. (2010). Análisis de suelos, la base para fertilizar adecuadamente los cultivos forrajeros. Buenos Aires: Producir XXI.
- Gannini-Kurina, F., Balzarini, M., Koritschoner, J., Rampoldi, A., & Hang, S. (2021). Modelos para la conversión de las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn entre los métodos de Mehlich III y DTPA-TEA en suelos de Córdoba. *Ciencia del Suelo*, Volume 39, 1-15.
- García, A. D. (1997). Comparison of soil test to determine micronutrients status in Argentina soils. *Soil Science and Plant Analysis*, Vol 28, 1777-1792.

- García, R., & Báez, A. P. (2012). Atomic Absorption Spectrometry. En M. A. Farrukh, *Atomic Absorption Spectrometry*. Mexico.
- Gupta, A. P. (2012). Elemental Profiling: Its Role and Regulations. En *Atomic Absorption Spectroscopy*. India: Muhammad Akhyar Farruk.
- Gutierrez Boem, F. H. (2016). Manejo de la fertilidad del suelo en planteos orgánicos. Facultad de Agronomía, UBA.
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté S. A.
- Izário Filho, H. J., Santos Salazar, R. F., Capri, M. d., Kondracki de Alcântara, M. A., & Castro Peixoto, A. (2012). State-of-the-Art and Trends in Atomic Adsorption Spectrometry. En M. A. Farrukh, *Atomic Absorption Spectroscopy*. University of Central Punjab.
- Jankowski, K., & Reszke, E. (2010). Instrumentation for Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. En *Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry*. Chapter 2, Vol 335.
- Jordán López, A. (2005). Manual de Edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla .
- Kazimierz Kęsika, T. J. (2005). Adaptation of the Mehlich 3 procedure for routine determination of phosphorus, potassium and magnesium in soil. *Przemysl Chemiczny*.
- Kirkby, E., & Römheld, V. (2007). *Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility*. United Kingdom: The International Fertilizer Society.
- Kloster, N., Perez, M., & Mazzaferro, F. (2019). A Rapid and Simple Manifold to Study Exchangeable Cations and Cation Exchange Capacity in 24 Soil Samples Simultaneously. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.
- Lindsay, W. C. (1985). Micronutrient soil testing for the tropics. *Developments in Plant and Soil Sciences*, Vol 14.
- Lindsay, W., & Norvell, W. (1978). Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science American Journal*, Vol 42, 421-428.
- Marbán, L. & Ratto S.E. (2005). Tecnologías en análisis de suelos. Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.

- Martinez, S., Sanchez, R., & Todolí, J.-L. (2023). High temperature total consumption sample introduction system coupled to microwave plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) for the analysis of aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, Vol 1249.
- Martinez, S., Sanchez, R., Lefevre, & Todolí, J.-L. (2022). Multi-elemental analysis of oil renewable fuel feedstock. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Vol 189.
- Miretti, M., Pilatti, M., & Imhoff., R. L. (2012). Historia de uso del suelo y contenido de micronutrientes en argiudoles del centro de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Cienc. Suelo Vol 30*, 67-30.
- Mocak, J., Bond, A., & Scollary., S. M. (1997). . A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. *Pure and Applied Chemistry*, Vol 69, 297-328.
- Moreno-Jimenez, E. y otros, 2019. Aridity and reduced soil micronutrient availability in global drylands. Vol 2, 371-377.
- Niedzielski, P., Kozak, L., Wachelka, K., Jakubowski, & Wybieralska, J. (2015). The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP-OES) in 23 elements determination in geological samples. *Talanta*, Vol 132, 591-599.
- Olivieri, A. (2014). Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. *Chemical Reviews*, Vol 114, 5358-5378. DOI: 10.1021/cr400455s.
- Pelizzaro, V., Pensato, A., Carcano, A., & Costedoat, M. (2019). Determination of Macro and Micronutrients in Fertilizers using MP-AES Fast analysis of six elements in mineral and organo-mineral fertilizers. *Agilent Technologies*.
- Praveen Sarojam, P. (2009). *Analysis of Micronutrients in Soil by Using AA 800 Atomic Absorption Spectrophotometer*. India: PerkinElmer Global Application Center. Obtenido de www.perkinelmer.com
- Quiroga, A., & Romano, N. (2012). Manual de fertilidad y evaluacion de suelo. EEA Anguil: INTA.

- Ratto, S. (2006). Los microelementos en el sistema productivo del área pampeana. En *Micronutrientes en la agricultura* (págs. 79-112). Buenos Aires, Argentina.: Asociacion Argentina de la Ciencia del Suelo.
- Reed, S. T. & D. C. Martens. (1996). Chapter 26: copper and zinc. In: *Methods of soil analysis, Part3-chemical methods*. Sparks D. L. (ed.). Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 703-722.
- Rimski-Korsakov, H., & Álvarez, C. R. (2016). Manejo de la fertilidad del suelo en planteos orgánicos. Facultad de Agronomía, UBA.
- Roca-Fernández, A. I., & Paz-González, A. (2008). Análisis de los elementos disponibles en el suelo tras la adición de compost procedente de RSU. Murcia, España: Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.
- Serrano Raquel, A. E. (2022). Determination of elemental bioavailability in soils and sediments by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES): Matrix effects and calibration strategies. *Talanta*, Vol 240.
- Skoog, D. H. (2007). *Principios de análisis instrumental*.
- Sparks, D. L. (1996). *Methods of soil analysis Part 3 - Chemical methods*. Madison: Soil Science Society of America, American Society of Agronomy.
- Teodoro, M., Schiavo, D., & Ferreira Abreu, M. (2013). *Determination of metals in soil by microwave plasma - atomic emission spectrometry (MP-AES) using DTPA extraction*. São Paulo, SP, Brazil: Agronomic Institute of Campinas, Agilent Technologies.
- Ulloa Guitián, M., & Abreu, C. P. (2001). Macro and micronutrients availability in acropped soil in Mabegondo (A Coruña). *Cadernos Lab, Xeoloxico de LaxeCoruña*, Vol. 26, 243-254.
- Van Raij, B. (1994). New diagnostic techniques, universal soil extractants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Vol 25, 799-816.
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934).). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, Vol 37, 29-38. doi:10.1097/00010694- 193401000-00003.

Wei Li, P. S. (2013). Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, Vol 112, 43-48.