

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE DIGESTIÓN POR VÍA SECA PARA
LA DETERMINACIÓN DE NUTRIENTES MINERALES EN MUESTRAS
VEGETALES**

por

Sergio Daniel MALUTIN CARBALLO

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Carlos Perdomo (Phd)

Ing. Agr. José Zamalvide

Ing. Agr. Marcelo Ferrando (MSc)

Fecha: 30 de setiembre de 2013

Autor:

Sergio Daniel Malutin Carballo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis dos amores Rosina y Micaela por todo el apoyo que me brindan día a día, a mi madre y mis hermanos, Yuri, Mónica, Silvia y Liliana.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Fertilidad y del Departamento de Suelos y Aguas de la Facultad de Agronomía, gracias.

A Carlos Perdomo por ser mi guía y director en este trabajo, por su paciencia, gracias.

A Leticia Martínez por su invaluable colaboración y por enseñarme a manejar el espectrómetro de absorción atómica, gracias Leti.

A José “Pepe” Zamalvide y Marcelo Ferrando por las correcciones realizadas, gracias.

A Sully y todo el equipo de biblioteca, muchas gracias

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1 EFECTIVIDAD DEL USO DEL HF EN LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLANTAS CON ALTOS CONTENIDOS DE SILICIO.....	4
2.2 FUNCIONES DEL SILICIO EN LA PLANTA.....	6
2.3 MECANISMO DE ABSORCIÓN Y RANGOS DE ACUMULACIÓN DEL SILICIO EN LAS PLANTAS.....	7
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	9
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES UTILIZADAS EN FAGRO E INIA PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn.....	10
3.2 PROTOCOLOS ANALÍTICOS UTILIZADOS EN FAGRO PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn.....	10
3.2.1 <u>Oxidación a alta temperatura (ceniza seca) y</u> <u>disolución con HCl al 20 %</u>	10
3.2.2 <u>Oxidación a alta temperatura (ceniza seca) y disolución</u> <u>con 10.0 mL de HNO₃ + 2.0 mL de HF</u>	11
3.3 PROTOCOLO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DEL INIA LA ESTANZUELA PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn.....	12
3.3.1 <u>Determinación de micro y macro elementos en material</u> <u>vegetal por vía seca</u>	12
3.4 COMPARACIÓN ENTRE LOS PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE FAGRO E INIA.....	12

3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LIMPIEZA DE LOS CRISOLES.....	13
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
3.7 OTRAS COMPARACIONES.....	14
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	16
4.1 RESULTADOS.....	16
4.1.1 <u>Limpieza previa de los crisoles utilizados en la etapa de digestión de las muestras</u>	16
4.1.2 <u>Determinación de K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn en las ocho muestras de planta analizadas</u>	17
4.1.2.1 Muestra de arroz I.....	17
4.1.2.2 Muestra de arroz II.....	20
4.1.2.3 Muestra de corteza de eucalipto.....	20
4.1.2.4 Muestra de hoja de eucalipto.....	22
4.1.2.5 Muestra de planta entera de maíz.....	23
4.1.2.6 Muestra de tallos jóvenes de maíz de WEPAL.....	25
4.1.2.7 Muestra de sorgo de WEPAL.....	26
4.1.2.8 Muestra de alfalfa de WEPAL.....	27
4.2 DISCUSIÓN.....	28
4.2.1 <u>Limpieza de crisoles</u>	28
4.2.2 <u>Efecto de la técnica de digestión-disolución en el resultado analítico de las muestras analizadas</u>	28
4.3 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CATIONES DETERMINADOS CON HCl Y HF.....	30
4.3.1 <u>Relaciones de concentración para las muestras de arroz I, arroz II, corteza de eucalipto, hojas de eucalipto y maíz</u>	30
4.3.2 <u>Relaciones de concentración HCl/HF para las muestras de maíz, sorgo y alfalfa de WEPAL</u>	32
4.3.3 <u>Efecto de la temperatura de secado en el porcentaje de materia seca (MS) de seis muestras de especies diferentes</u>	35
5. <u>CONCLUSIONES</u>	37
6. <u>RESUMEN</u>	38
7. <u>SUMMARY</u>	39

8. BIBLIOGRAFÍA..... 40

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Clasificación de plantas en función del contenido de Silicio.....	8
2.	Identificación de las materiales utilizados según especie y origen.....	9
3.	Determinación de restos K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn (como % o ppm en planta) en la primera (L1) y segunda (L2) limpieza con HF más HNO ₃ de 12 crisoles de porcelana	16
4.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de arroz I (realizadas en FAGRO: FA).....	19
5.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de arroz II (realizadas en FAGRO: FA).....	21
6.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de corteza de eucalipto (realizadas en FAGRO: FA).....	22
7.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra	

	de hoja de eucalipto (realizadas en FAGRO: FA).....	23
8.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de planta entera de maíz (realizadas en FAGRO: FA)	24
9.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de tallos jóvenes de maíz de WEPAL (realizadas en FAGRO: FA).....	25
10.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de sorgo de WEPAL (realizadas en FAGRO: FA).....	26
11.	Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de alfalfa de WEPAL (realizadas en FAGRO: FA).....	27
12.	Porcentajes de recuperación de cationes determinados con la técnica de HCl en relación a los resultados obtenidos con la técnica de HF, para dos variantes (FAGRO e INIA) de la primer técnica obtenidos en distintos substratos vegetales	32
13.	Porcentaje de recuperación de cationes determinados	

	con las técnicas de HF_FA, HCl_FA y HCl_INIA, en relación a los resultados obtenidos por WEPAL en distintos substratos vegetales	34
14.	. Porcentaje de MS obtenido con dos temperaturas de secado (60 y 70 °C) y relación de MS obtenida a estas dos temperaturas en seis muestras de planta.....	36
Figura No.		
1.	Diferencia de concentración de K en planta entre las técnicas HF_FA y HCl_FA en función de la concentración de Si de la muestra	30

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de plantas refleja la concentración de un nutriente en la planta, y constituye un valor que integra todos los factores involucrados en su crecimiento, siendo los principales el suelo, el clima, la especie, el manejo del cultivo y, fundamentalmente, la disponibilidad de ese nutriente en el suelo (Barbazán, 1998).

Según Barbazán (1998) los primeros trabajos para interpretar los datos de análisis de plantas fueron presentados por Macy en 1936, y desde entonces se han hecho muchos esfuerzos para usar el análisis de plantas como una herramienta útil para el diagnóstico nutricional de un cultivo.

En las últimas dos décadas ha habido un gran avance en el desarrollo de la velocidad y la eficiencia de los instrumentos para las determinaciones de elementos químicos en muestras de plantas. Sin embargo, las técnicas de preparación y acondicionamiento de las muestras no se han desarrollado a la misma velocidad y son aún el mayor factor que contribuye a resultados analíticos inciertos (Al-Harahsheha et al., 2009).

Algunos análisis químicos de muestras de plantas tienen dos etapas: la digestión-disolución del elemento y su posterior determinación. Una vez que se extraen los elementos de la matriz y pasan a formar parte de una solución debe realizarse la segunda etapa que es la determinación del mismo (Barbazán, 1998).

Para que el análisis de planta pueda ser utilizado como método de diagnóstico efectivo deben cumplirse una serie de condiciones que incluyen desde la estandarización del acondicionamiento y preparación de la muestra, el análisis propiamente dicho, hasta la interpretación de los resultados obtenidos, tomando en cuenta valores de referencia que permitan un diagnóstico adecuado de la muestra a analizar (Millán y Abadía, 1981).

En Uruguay la mayoría de los análisis de plantas realizados para diagnosticar deficiencias de nutrientes, como los realizados en apoyo a investigación, se basan en la determinación de nutrientes determinados a partir de muestras digeridas con H_2SO_4 o a partir de digestión por vía seca. Sin embargo, algunos autores han encontrado que la concentración de nutrientes puede cambiar según el procedimiento utilizado. La exactitud con la cual se obtiene una determinada concentración de nutrientes es

importante cuando se usa el análisis de plantas para ajustar dosis de recomendación de fertilización en algunos cultivos.

Se ha visto que las técnicas tradicionales de determinación de minerales en muestras con alto contenido de Si, como el arroz, no resultan tan efectivas al momento de disolver las cenizas, por lo que distintos autores recomiendan el uso de HF en la etapa de disolución de la muestra.

Poykio y Peramaki (2003) realizaron una investigación con el objetivo de encontrar un procedimiento adecuado para la digestión de elementos traza en muestras de plantas con alto contenido de silicio (Si) para estudios medioambientales. La técnica planteada comparaba distintas mezclas de ácidos, ácido nítrico (HNO_3); HNO_3 + ácido perclórico (HClO_4); HNO_3 + peróxido de hidrógeno (H_2O_2), incluyendo la mezcla de ácido fluorhídrico (HF) más HNO_3 en acículas de pino. Estos autores concluyeron que la mezcla de HF y HNO_3 resultó ser la más efectiva para determinar Titanio (Ti) y Hierro (Fe), en muestras con altos contenidos de Si. Cabe aclarar que el HNO_3 , la mezcla de HNO_3 + HClO_4 y la mezcla de HNO_3 + H_2O_2 fueron utilizadas en la etapa de digestión líquida de la muestra, mientras que, la mezcla de HF más HNO_3 fue utilizada en la etapa de disolución de las cenizas.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar dos técnicas de digestión-disolución luego de la conversión a cenizas por vía seca de muestras vegetales; para ello se realizaron ensayos comparando las siguientes técnicas: a) la utilizada en el Laboratorio de Análisis de Plantas de la Cátedra de Fertilidad de la Facultad de Agronomía (digestión por vía seca y disolución de las cenizas con HCl), y b) una variante de la técnica utilizada por Poykio y Peramaki (2003) (digestión por vía seca y disolución de las cenizas con HF más HNO_3), en diferentes matrices vegetales.

Se analizaron ocho materiales vegetales de distinto origen: cinco muestras de plantas obtenidas localmente (dos de planta entera de arroz y una de maíz; una de corteza y otra de hoja de eucalipto), y otras tres muestras internacionales provenientes del Wageningen Evaluating Programs for Analytical Laboratories (WEPAL, 2010) (una de alfalfa, una de maíz y una de sorgo). El Programa WEPAL es un servicio de comparación interlaboratorios de la Universidad de Wageningen (Países Bajos).

Todas las determinaciones se realizaron por métodos instrumentales; donde Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe) y Zinc (Zn) se determinó por Espectrometría

de Absorción Atómica mientras que Potasio (K) y Sodio (Na) se determino por Espectrometría de Emisión Atómica, en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos de FAGRO. Además, una submuestra de cada una de estas ocho muestras fue enviada al Laboratorio de Análisis de Plantas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, con el objetivo de comparar resultados con otro laboratorio que utiliza una técnica de digestión-disolución y determinación similar a la utilizada en el laboratorio de FAGRO (HCl_INIA).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EFECTIVIDAD DEL USO DEL HF EN LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLANTAS CON ALTOS CONTENIDOS DE SILICIO

Muchas técnicas analíticas como Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) y Espectrometría de Emisión Atómica (AES) requieren de una digestión y disolución previa de la muestra (Poykio y Peramaki, 2003). Esta preparación previa de la muestra es la etapa que tiene el mayor efecto sobre los resultados finales; lo cual es especialmente relevante en la determinación de minerales y elementos trazas en muestras de plantas que no son homogéneas (Poykio y Peramaki, 2003).

Para que los métodos de digestión sean efectivos deben descomponer eficientemente la matriz de la muestra, logrando que los elementos de interés sean solubilizados; además los minerales deben estar en una forma química acorde al método de análisis que se va a utilizar para su determinación (Poykio y Peramaki, 2003). Los procedimientos de digestión de muestras que emplean solo HNO_3 , o la mezcla de HNO_3 más H_2O_2 o, incluso, HNO_3 y HClO_4 no siempre aseguran una completa digestión de la muestra y la disolución de las cenizas (Poykio y Peramaki, 2003).

Esta dificultad en la descomposición de la muestra vegetal es particularmente grave cuando la misma tiene altos contenidos de Si, por lo cual para lograr una adecuada disolución de las cenizas se recomienda utilizar HF (Novozamsky et al., 1995). Según Lamble y Hill (1998), las digestiones utilizando HNO_3 solo o en combinación con H_2O_2 han demostrado ser generalmente efectivas en el análisis de distintas muestras vegetales, pero estos métodos tradicionales no son efectivos para analizar muestras con alto contenido de Si, donde se hace necesario la utilización de HF. Según estos autores, esta última técnica es la única que permite obtener buenos resultados en la determinación de Al y Fe en tejidos vegetales con alto contenido de Si. En cambio, si las muestras no tienen altos niveles de Si el uso de HF no presenta ninguna ventaja (Lamble y Hill, 1998).

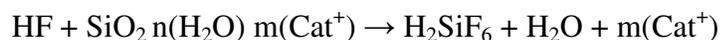
Esta relación entre contenido de Si de las plantas y la necesidad de usar HF para una correcta determinación de la concentración de elementos fue confirmada por Llimous y Fallavier (1996). Estos autores realizaron la comparación de dos técnicas de digestión en seco (con y sin el uso de HF) para la determinación de K, Ca y Mg en muestras con alto contenido de Si, utilizando para ello hojas de palma aceitera (*Elaeis*

guineensis). Estos autores llegaron a la conclusión de que cuando la muestra tenía un contenido de Si mayor a 3,5 % las digestiones sin el uso de HF dieron resultados más bajos (sobre todo de K) que cuando se utilizó HF en la digestión del material. En cambio, cuando el contenido de Si en la muestra fue menor a 3,5 % los dos métodos de digestión (con y sin HF) dieron resultados similares. La variación entre los dos métodos se correlaciona positivamente con el contenido de Si en la muestra de planta: cuanto más alto es el nivel de Si, mayores son las desviaciones en el resultado del análisis entre los dos procedimientos. Por lo tanto, si se desea obtener resultados exactos y precisos en la determinación de elementos minerales en muestras de plantas con altos contenidos de Si, es recomendable la utilización del HF en los procedimientos de digestión de este tipo de muestras (Llimous y Fallavier, 1996).

Lamble y Hill (1998), en una revisión crítica sobre procedimientos de digestión en microondas para determinar elementos traza de materiales de distintos orígenes, reportaron que, para obtener recuperaciones completas de Fe y Al fue necesario en muchos casos la digestión con HF. Estos dos elementos tienen una fuerte tendencia a asociarse a los silicatos. Poykio y Peramaki (2003) también subrayan que los elementos como Fe y K, con tendencia a unirse a silicatos, son los que requieren del uso de HF en la digestión. En cambio, los elementos como Cu y Zn, que se liberan fácilmente de las matrices biológicas, pueden ser determinados fácilmente utilizando diversos ácidos durante el procedimiento de digestión (Lamble y Hill, 1998).

Poykio y Peramaki (2003) analizaron acículas de pino utilizando digestión por vía seca, y encontraron que la utilización del HF fue necesaria para una correcta disolución y descomposición de la muestra. Cuando compararon los resultados de este ácido contra la utilización de otros, determinaron valores de Fe aproximadamente 1,1 veces mayores que cuando se utilizó HNO₃ solo o en combinación con HClO₄. Además, los valores hallados para Titanio con HF fueron 1,5 veces mayores que cuando se utilizó HNO₃ solo o combinado con H₂O₂.

La efectividad en el uso del HF en muestras de planta con alto contenido de Si se debe a que este ácido tiene la capacidad de disolver los polímeros de SiO₂ que integran cationes (Cat⁺) en su estructura. La reacción de disolución de la matriz con Si por la acción del HF se puede resumir de la siguiente manera (Gaudino et al., 2007).



2.2 FUNCIONES DEL SILICIO EN LA PLANTA

El Si es un nutriente beneficioso para la biología de las plantas. Según lo expresado por Heckman (2012) el Si puede aliviar varias condiciones desfavorables como: vuelco, sequía, temperaturas extremas, heladas, irradiación UV, estrés químico como salinidad, toxicidad por metales pesados y desbalances nutricionales.

En las gramíneas forrajeras, además de tener un rol estructural, el Si ayuda a proteger la planta de ataques de insectos, enfermedades y estrés medioambientales. Incluso hay cultivos que responden positivamente al suplemento con Si, incrementando el rendimiento de las cosechas aún bajo condiciones de crecimiento favorable y en ausencia de enfermedades, como en el caso del arroz (Heckman, 2012).

Según Malavolta et al. (1989), Salisbury y Ross (2000), cuando el Si se acumula en la pared de células epidérmicas de las hojas del arroz provoca la disminución de la transpiración, así como de las infecciones producidas por hongos. En suelos pobres en Si disponible la adición de silicatos disminuye la severidad de las enfermedades causadas por *Bipolaris oryzae* y *Pyricularia grisea* y aumenta el rendimiento (Malavolta et al., 1989). El aumento del tenor de Si también aumenta la resistencia del arroz a los hongos *Helminthosporium oryzae* e *Pyricularia oryzae* pero hasta cierto punto. Además el Si incrementa la rigidez de las células del xilema limitando la compresión por el viento. Por tanto, una planta de arroz deficiente en Si estará más susceptible al vuelco.

Según Malavolta et al. (1989) el elevado tenor de Si en el arroz está acompañado de la disminución en el tenor de Fe y de la toxicidad provocada por este, debido a que el Si aumenta la rigidez de los vasos que conducen el oxígeno desde la parte aérea a las raíces, mejorando el transporte de este último. La absorción del Fe en esta gramínea es inversamente proporcional al poder oxidante de las raíces. El Manganeso (Mn) también puede ser tóxico cuando se acumula en las hojas, provocando manchas necróticas. En presencia del Si, el Mn es distribuido más uniformemente reduciendo su toxicidad (Malavolta et al., 1989).

2.3 MECANISMO DE ABSORCIÓN Y RANGOS DE ACUMULACIÓN DEL SILICIO EN LAS PLANTAS

Según Salisbury y Ross (2000) el Silicio (Si) está presente en la solución del suelo como ácido monosilícico (H_4SiO_4) y es absorbido por las plantas en esta forma, por difusión pasiva, para luego acumularse en forma de polímeros de Si amorfo hidratado ($\text{SiO}_2 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$) en las paredes de las células epidérmicas especializadas conocidas como células silíceas, pero también en las paredes primarias y secundarias de las células de la raíz, el tallo y las hojas; para luego, después de solidificado, tornarse inmóvil en la planta (Malavolta et al., 1989). Según Epstein (1994) las concentraciones de Si en el suelo puede variar de 0,1 a 0,6 mM.

Las concentraciones de Si en planta pueden variar según la especie y la disponibilidad de este elemento en el suelo. Es frecuente encontrar en varias especies concentraciones de Si en planta mayores a las de macronutrientes como Nitrógeno (N), Fósforo (P) o K (Malavolta et al., 1989). Según Takahashi et al. citados por Alcántar y Trejo-Téllez (2009) las plantas pueden ser clasificadas según su contenido de Si como: 1) acumuladoras, 2) intermedias y 3) no acumuladoras de Si (Cuadro No. 1).

Según Heckman (2012) las gramíneas y otras monocotiledóneas tienden a acumular Si. Especies como trigo, avena, cebada, sorgo y maíz pueden tener concentraciones de Si en el entrono a los 10,0 g/kg (1%) de la biomasa. Según Salisbury y Ross (2000), el maíz y otras gramíneas como el sorgo pueden llegar a acumular niveles de Si en el orden del 1,0 al 4,0% de su peso seco, mientras que el arroz puede contener valores de hasta 16,0% de Si en peso seco. En cambio, algunas plantas dicotiledóneas como soja, alfalfa, tomate y pepino, las cuales se consideran pobres acumuladoras de Si, pueden tener niveles de Si cercanos al 0,1% (Heckman, 2012).

Cuadro No. 1: Clasificación de plantas en función del contenido de Silicio

Tipo de planta	Concentración de Si en %	Ejemplos
Acumuladoras de Si	10 a 15	arroz
Intermedias	1 a 5	Cereales, caña de azúcar
No acumuladoras de Si	Menos de 0,5	Mayoría de dicotiledóneas

Fuente: Takahashi et al., citados por Alcántar y Trejo-Téllez (2009).

Malavolta et al. (1989) determinaron el tenor de Si de algunas plantas cultivadas en Brasil encontrando para maíz valores de 0,67% en hojas más tallos y 0,1% en el grano, mientras que para arroz encontraron valores de 4,0% en hojas más tallos y 8,0% en la cáscara del grano. En este cultivo el 90% del Si acumulado se encuentra en la parte aérea. En gramíneas forrajeras los valores encontrados estuvieron entre 0,8 y 3,9%.

Los investigadores Cooke y Leishman (2012) determinaron en hojas de *Eucalyptus haemastoma* concentraciones de Si del orden de 0,10 a 0,34%, mientras que Hulme (2008) reportó para la corteza de *Eucalyptus camaldulensis* concentraciones de Si de 0,10%.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos de comparación entre las dos técnicas de extracción (extracción con HCl vs extracción con HF más HNO₃) planteadas en esta tesis, se utilizaron dos muestras de planta entera de arroz y una de maíz. Además, se incluyeron dos muestras de eucalipto: una de corteza y una de hoja (Cuadro No. 2). Estas muestras fueron obtenidas localmente.

Se utilizaron también tres muestras provenientes de Países Bajos del Wageningen Evaluating Programs For Analytical Laboratorios (WEPAL): una de planta entera de alfalfa y una de sorgo y una de tallos jóvenes de maíz (Cuadro No. 2). El Programa WEPAL es un servicio de comparación interlaboratorios de la Universidad de Wageningen (Países Bajos). Las concentraciones de Si reportados por WEPAL para las muestras de alfalfa, maíz y sorgo utilizadas en esta tesis fueron de 0,14, 0,55 y 0,80 %, respectivamente.

Cuadro No. 2: Identificación de los materiales utilizados según especie y origen.

Muestra	Origen	País
Planta entera de arroz I	Facultad de Agronomía	Uruguay
Planta entera de arroz II	Facultad de Agronomía	Uruguay
Corteza de eucalipto	Facultad de Agronomía	Uruguay
Hoja de eucalipto	Facultad de Agronomía	Uruguay
Planta entera de maíz	Facultad de Agronomía	Uruguay
Tallos de maíz (M ¹ 2-P ² 2-Año 2010)	WEPAL	Países Bajos
Planta entera de sorgo (M3-P2-Año 2011)	WEPAL	Países Bajos
Planta entera de alfalfa (M3-P2-Año 2010)	WEPAL	Países Bajos

1 M = Material

2 P = Período

En el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Facultad de Agronomía (FAGRO) estas ocho muestras fueron molidas con un molino Wiley y secadas por dos horas antes de ser convertidas a cenizas por vía seca, para luego realizar dos procedimientos diferentes de disolución (extracción con HCl vs extracción con HF más HNO₃). En la solución resultante se determinaron los elementos K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn.

Una submuestra de cada una de estos materiales fue enviada al Laboratorio de Análisis de Plantas del INIA La Estanzuela para que se determinaran los mismos elementos que en FAGRO. De esta forma se obtuvo de un laboratorio de referencia en el país, un dato más para poder compararlos con los resultados obtenidos de los ensayos planteados en este estudio. Los protocolos de los procedimientos de extracción utilizados se describen a continuación.

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES UTILIZADAS EN FAGRO E INIA PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn.

Independientemente del procedimiento de extracción, se utilizó el mismo método de determinación para cada uno de los cationes analizados. Las metodologías de determinación utilizadas fueron Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) y Espectrometría de Emisión Atómica (AES).

3.2 PROTOCOLOS ANALÍTICOS UTILIZADOS EN FAGRO PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn

3.2.1 Oxidación a alta temperatura (ceniza seca) y disolución con HCl al 20 %

Se pesa en una balanza analítica 1,000 g de muestra de planta previamente secada por dos horas a 65 °C en una estufa. Se coloca dentro de un crisol de porcelana. Luego se colocan los crisoles en una plancha para quemar la muestra hasta que dejan de liberar humo; posteriormente se introducen en un horno mufla y luego que se alcanza la temperatura de 450 °C (aproximadamente 1,5 horas), se deja la muestra por cuatro horas más hasta transformar las mismas en cenizas.

Se apaga el horno y se deja alcanzar la temperatura ambiente en el horno mufla para luego retirar las muestras; tomar la precaución de no perturbar las mismas mientras se transfieren desde el horno a la mesada de trabajo. Se agregan unas gotas de agua destilada a las cenizas para evitar proyecciones al momento de disolver las mismas. Con pipeta automática se agrega a las cenizas 5,0 mL de solución de HCl al 20 %. Cuantitativamente se transfiere el contenido del crisol dentro de un matraz volumétrico de vidrio de 50 mL para luego diluir hasta volumen con agua destilada; se tapa y mezcla bien.

Para el análisis elemental de la muestra de planta digerida se utiliza el Espectrómetro de Absorción Atómica modelo Perkin Elmer 373 del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de FAGRO.

Se calibra el equipo usando soluciones estándar con distintas concentraciones del analito a determinar, además de una solución blanco; se registran las concentraciones de los distintos analitos en porcentaje para K, Ca y Mg, mientras que, en partes por millón (ppm o mg kg⁻¹) para Na, Fe y Zn. Para la determinación de los minerales se utilizó el protocolo establecido en el manual de Perkin Elmer.

3.2.2 Oxidación a alta temperatura (ceniza seca) y disolución con 10,0 mL de HNO₃ + 2,0 mL de HF

Se pesa en una balanza analítica 0,250 g de cada muestra de planta previamente secada en una estufa por dos horas a 65 °C. Se coloca la muestra dentro de un crisol de porcelana de 60 mL de capacidad, previamente numerado. Se coloca los crisoles en una plancha hasta que dejen de liberar humo, y se lleva a un horno mufla durante cuatro horas a 450 °C.

Luego se apaga el horno, se deja enfriar las muestras y se retiran tomando la precaución de no perturbar las muestras de cenizas mientras se transfieren desde el horno a la mesada. Se agrega unas gotas de agua destilada a los crisoles para evitar proyecciones al momento de agregar los ácidos; se realiza la disolución de las cenizas con el agregado de 10 mL de HNO₃(65%) más 2 mL de HF (40%) con pipeta automática.

Cuantitativamente se transfiere el contenido de los crisoles dentro de un matraz volumétrico de plástico de 50 mL para luego diluir las muestras hasta volumen con agua destilada, se tapa y se mezcla bien.

Se calibra el Espectrómetro de Absorción Atómica usando soluciones patrón diluidas en 10 mL de HNO₃ y 2 mL de HF con distintas concentraciones del compuesto a determinar, además de una solución blanco; se registran las concentraciones de los distintos analitos en porcentaje para K, Ca y Mg y en partes por millón (ppm) para Na, Fe y Zn.

3.3 PROTOCOLO UTILIZADO EN EL LABORATORIO DEL INIA LA ESTANZUELA PARA LA DETERMINACIÓN DE K, Ca, Mg, Na, Fe Y Zn

3.3.1 Determinación de micro y macro elementos en material vegetal por vía seca

Se pesa 1,000g de muestra molida y se coloca en crisoles de 30 mL. Luego se colocan en la mufla a 500 °C durante 6 horas, se retiran de la mufla se deja enfriar y se agregan 5 mL de HCl 6 N. Posteriormente se dejan los crisoles evaporando en plancha a 100 °C. Disolver la ceniza en 20 mL de HCl 2 N. Luego se transfiere el contenido a matraces de 50 mL y se lleva a volumen con agua destilada. Se filtran a frascos plásticos y se obtiene el extracto B. Para la determinación de Fe y Zn se realiza la lectura directa del extracto B por absorción atómica.

Para la determinación de Ca, Mg y K se toma 0,2 mL del extracto B y se transfiere a erlenmeyer de 50 mL, se agrega 1,0 mL de Lantano al 5% y 8,8 mL de H₂O. Se realiza la lectura por Absorción Atómica de Ca y Mg y por Emisión Atómica el K.

Para la lectura del Na, se toma 0,2 mL del extracto B y se transfiere a un erlenmeyer de 50 mL, luego se le agrega 1,0 mL de KCl al 1% y 8,8 mL de H₂O destilada. La lectura se realiza por Emisión Atómica.

3.4 COMPARACIÓN ENTRE LOS PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE FAGRO E INIA

En los procedimientos de digestión utilizados en FAGRO se realiza una única disolución de las cenizas utilizando HCl al 20% o HF más HNO₃ según el protocolo, mientras que en el laboratorio del INIA se realizan dos disoluciones, la primera con HCl 6 N y la segunda con HCl 2 N obteniéndose el extracto B.

En FAGRO para la determinación de Ca y Mg se realiza previamente la dilución de la muestra con una solución de Lantano al 0,2% (relación de dilución 1:20). En INIA para la determinación de Ca, Mg y K y Na se toma 0,5 mL del extracto B y se agregó 2,5 mL de Lantano al 5% más 22 mL de H₂O.

En FAGRO las determinaciones de K, Na, Fe y Zn se realizan directamente de la ceniza disuelta con HCl o HF más HNO₃, según el protocolo. En INIA los cationes Fe y Zn se determinaron directamente del extracto B.

Para identificar los métodos de digestión (combinaciones de extracción-determinación) se utilizaron las siguientes abreviaciones:

HCl_FA: Técnica con HCl en el Laboratorio de Facultad de Agronomía

HF_FA: Técnica con HF más HNO₃ en el Laboratorio de Facultad de Agronomía

HCl_INIA: Técnica con HCl en el Laboratorio de INIA La Estanzuela.

3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LIMPIEZA DE LOS CRISOLES

Con el fin de verificar la existencia de impurezas adheridas a la pared de los crisoles es que se evaluó otra metodología para la limpieza de los mismos. En fagro el lavado se realiza con HCl al 10%. La limpieza consistió en el agregando de 2 mL de HF más 10 mL de HNO₃ a los doce crisoles utilizados en la tesis, luego esta mezcla se traspasó a un matraz de plástico y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua destilada. Posteriormente esta solución fue leída en el espectrómetro de absorción atómica como si fuera una muestra de planta más, para luego determinar la presencia de restos de bases y micro nutrientes adheridos a la pared del crisol. Estos restos de minerales adheridos a la pared de los crisoles pueden ser disueltos por los ácidos utilizados en la disolución de las cenizas e interferir en los resultados de las muestras analizadas. Este procedimiento se realizó dos veces en cada crisol. Se presenta en el Cuadro No. 3 el resultado de la limpieza de los crisoles utilizados en la Tesis.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron los análisis de la varianza (Anova) para los cationes Ca, Fe, K, Mg, Na, y Zn, considerando como fuentes de variación 1) los dos métodos de digestión (HCL_FA y HF + HNO₃_FA) y 2) número de repeticiones del análisis (entre 5 y 8, dependiendo de la muestra).

La fecha se consideró como un efecto bloque, ya que se asumió que cada día de análisis tuvo condiciones similares de temperatura y otras condiciones de laboratorio, pero que estas condiciones fueron diferentes entre días, ya que el período de análisis abarcó más de un año. Esto se realizó mediante la cuantificación de la concentración de los elementos en las ocho muestras utilizadas. El software utilizado fue InfoStat/E.

El modelo utilizado para el análisis estadístico de los resultados de FAGRO fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = es la cuantificación de la concentración de los elementos (Ca, Fe, K, Mg, Na, y Zn) en las diferentes muestras analizadas.

μ = corresponde a la media general.

τ_i = es el efecto de la técnica de digestión y el tipo de ácido utilizado en el procedimiento de disolución de las cenizas.

β_j = es el efecto de la fecha de análisis.

ε_{ij} = es el error experimental asociado a la observación Y_{ij} .

3.7 OTRAS COMPARACIONES

Se calculó el dato promedio (para todas las fechas) de la concentración de cada elemento en las ocho muestras analizadas, según el método utilizado en el Laboratorio de FAGRO. Esta información fue utilizada para calcular el porcentaje de recuperación, estimado como la relación de concentración entre la técnica de digestión con HCl y la técnica de digestión con HF más HNO_3 .

$$\frac{(X_i \text{ HCl}) \times 100}{X_i \text{ HF} + HNO_3}$$

siendo X_i = el dato promedio de concentración para cada elemento

Se comparó también el dato promedio (de todas las fechas) de la concentración determinado en FAGRO para cada elemento con la técnica de digestión con HF más HNO_3 contra los resultados obtenidos por el INIA La Estanzuela para todas las muestras.

$$\frac{(X \text{ INIA}) \times 100}{X_i \text{ HF} + HNO_3}$$

siendo X = el dato de concentración para cada elemento

siendo X_i = el dato promedio de concentración para cada elemento

Para el caso de las tres muestras de WEPAL (sorgo W, maíz W y alfalfa W), se compararon, además, los resultados obtenidos para estas muestras en FAGRO e INIA con los propios resultados de WEPAL. Se tomó el dato de este último como base cien para el cálculo del porcentaje de recuperación. Los datos oficiales de WEPAL están disponibles en la página web de dicha institución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Limpieza previa de los crisoles utilizados en la etapa de digestión de las muestras

Cuadro No. 3. Determinación de restos de K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn (como % o ppm en planta) en la primera (L1) y segunda (L2) limpieza con HF más HNO₃ de 12 crisoles de porcelana.

No. Crisol	K		Ca		Mg		Na		Fe		Zn	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2
----- % -----												
1	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	75	0	0	0
2	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	66	0	0	0
3	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	39	1	0	0
4	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50	0	2	2
5	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23	1	2	1
6	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24	0	1	1
7	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	30	0	1	1
8	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	25	0	1	1
9	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0	1	1
10	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	6	0	0	1
11	0,03	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	6	1	1	1
12	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	2	1	1	2

La contaminación de los crisoles fue más importante para el caso de K, donde se midieron en la primera limpieza concentraciones entre 0,01 a 0,03% (100 a 300 ppm) en la solución. En la medición de la segunda limpieza, en cambio, no se observó la contaminación con restos de K en la mayoría de los crisoles (11 de 12) a excepción de un caso.

Para Ca en la primera limpieza siete de los doce crisoles presentaron una contaminación de 0,01%, mientras que en la segunda limpieza en tan solo tres casos se midieron niveles de 0,01% (los crisoles No. 1, 9 y 11).

En lo que respecta al Mg no se encontró contaminación con este elemento en los crisoles en ninguna de las dos limpiezas realizadas.

Para Na, solo 4 de los doce crisoles presentaron niveles de 0,01% en la primera limpieza realizada, mientras que en la segunda limpieza no se constató contaminación en ninguno de los doce crisoles.

Para Fe se midieron valores de contaminación entre 20 y 75 ppm en ocho de los doce crisoles, mientras que los cuatro restantes presentaron entre 1 y 6 ppm en la primera limpieza realizada. En la segunda limpieza en solo cuatro casos se midió 1 ppm.

Por último para el Zn se midieron valores entre 1 y 2 ppm en nueve de los doce crisoles en las dos limpiezas realizadas; estos resultados pueden estar asociadas a interferencias o inestabilidad en el equipo y no tanto a contenidos reales de Zn en los crisoles, de todas formas los valores de contaminación fueron muy bajos.

4.1.2 Determinación de K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn en las ocho muestras de planta analizadas

4.1.2.1 Muestra de arroz I

Los resultados de análisis de los diferentes elementos analizados muestran gran variabilidad entre repeticiones, particularmente para Ca, Zn y Fe. Esta variabilidad puede ser el resultado de la falta de experiencia analítica del laboratorista (tesista), y no refleja la variabilidad normal del laboratorio de FAGRO.

En el caso de K, existió un efecto estadísticamente significativo de la técnica de digestión-disolución empleada (Cuadro No. 4); el valor promedio de ocho repeticiones obtenido con HF fue 25% mayor (1,36%) al obtenido con HCl (1,09%). Este mismo efecto significativo de la técnica de digestión-disolución empleada se observó en Mg, Na, Fe y Zn (Cuadro No. 4).

Para Ca, en cambio, el análisis de la varianza no reflejó diferencias significativas en la técnica de digestión-disolución empleada (Cuadro No. 4). De todos modos, a pesar de la falta de significación estadística observada en el caso de Ca, el porcentajes de recuperación calculado con el uso de HF más HNO₃ fue un 26% superior

al obtenido con el uso de HCl (Cuadro No. 12). Solo para Fe existió un efecto estadísticamente significativo de la fecha de análisis.

Por tanto a pesar de la variabilidad encontrada en los análisis que fue mayor a la del laboratorio FAGRO fue posible detectar diferencias significativas para varios elementos.

Cuadro No. 4. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de arroz I. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	Fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- %-----			----- ppm-----		
<u>HF_FA</u>	19/05/2011	1,18	0,10	0,10	561	179	21
	23/05/2011	1,24	0,10	0,12	595	196	20
	17/08/2011	1,53	0,15	0,11	548	268	31
	25/10/2011	1,38	0,18	0,12	708	154	24
	01/12/2011	1,39	0,29	0,12	609	195	23
	11/12/2011	1,52	0,11	0,12	653	191	26
	28/12/2011	1,41	0,12	0,13	581	186	25
	10/04/2012	1,25	0,18	0,13	565	200	45
<u>HCl_FA</u>	19/05/2011	1,04	0,12	0,11	526	99	17
	23/05/2011	1,09	0,12	0,10	484	104	17
	17/08/2011	0,82	0,11	0,09	489	175	18
	25/10/2011	1,19	0,15	0,12	574	122	12
	01/12/2011	1,14	0,10	0,12	493	130	22
	11/12/2011	1,21	0,11	0,11	480	114	21
	28/12/2011	1,24	0,12	0,12	596	120	13
	10/04/2012	1,02	0,15	0,10	495	215	23
<u>Media HF_FA</u>		1,36	0,15	0,12	603	196	27
<u>Media HCl_FA</u>		1,09	0,12	0,11	517	135	18
Anova							
F. V. ¹	gl	----- valor de <i>p</i> -----					
ME	1	0,0048	NS	0,0676	0,0050	0,0021	0,0084
Fecha	7	NS ²	NS	NS	NS	0,0855	NS
Error (Ácido x Fecha)	7	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo ($p > 0,10$).

4.1.2.2 Muestra de arroz II

Del análisis de la muestra de arroz II se desprende que para K existió un efecto estadísticamente significativo de la técnica de digestión-disolución empleada (Cuadro No. 5). También existieron diferencias significativas entre las técnicas para Mg, Fe y Zn. Para Ca y Na, en cambio, el análisis de la varianza no reflejó diferencias significativas en la técnica de digestión-disolución empleada. Solo para Fe existió un efecto estadísticamente significativo de la fecha de análisis (Cuadro No. 5).

Para Ca y Na los promedios calculados para la técnica de digestión-disolución con HF fueron superiores a los obtenidos con la técnica de digestión-disolución con HCl (Cuadro No. 5) a pesar de que no hubieron diferencias significativas.

4.1.2.3 Muestra de corteza de eucalipto

En esta muestra existieron diferencias significativas entre las técnicas de digestión-disolución únicamente para Fe (Cuadro No. 6). Para K, Ca, Mg, Na y Zn, en cambio, no existieron diferencias significativas entre las técnicas de digestión-disolución empleadas. También solo para Fe existió un efecto estadísticamente significativo en la fecha de análisis.

Solo para Ca y Zn los promedios calculados para la técnica de digestión-disolución con HF más HNO₃ fueron superiores a los obtenidos con la técnica de digestión-disolución con HCl (Cuadro No. 6) a pesar de que no hubo diferencias significativas.

Cuadro No. 5. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de arroz II. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		-----%-----			-----ppm-----		
HF_FA	19/05/2011	1,74	0,18	0,12	385	181	22
	23/05/2011	1,60	0,17	0,13	564	267	22
	17/08/2011	1,93	0,24	0,12	583	288	35
	01/12/2011	1,36	0,17	0,10	427	188	12
	11/12/2011	1,98	0,15	0,13	603	251	26
	28/12/2011	1,55	0,14	0,12	495	183	19
	10/04/2012	1,58	0,20	0,13	615	240	42
HCl_FA	19/05/2011	0,91	0,15	0,10	392	163	19
	23/05/2011	1,30	0,13	0,10	442	187	17
	17/08/2011	1,09	0,13	0,08	487	216	15
	01/12/2011	1,52	0,14	0,11	535	177	18
	11/12/2011	1,55	0,16	0,11	505	179	20
	28/12/2011	1,65	0,16	0,11	523	169	10
	10/04/2012	1,43	0,17	0,10	525	230	21
Media HF_FA		1,68	0,18	0,12	525	228	25
Media HCl_FA		1,35	0,15	0,10	487	189	17
Anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	0,0758	NS	0,0177	NS	0,0193	0,0615
Fecha	6	NS ²	NS	NS	NS	0,0685	NS
Error (Ácido x Fecha)	6	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

Cuadro No. 6. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de corteza de eucalipto. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	Fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- % -----			----- ppm -----		
HF_FA	01/12/2011	0,17	2,88	0,11	638	122	7
	11/12/2011	0,27	3,91	0,13	1099	128	4
	28/12/2011	0,18	3,23	0,12	619	115	10
	10/04/2012	0,24	3,48	0,12	900	200	10
	23/04/2012	0,23	3,09	0,14	975	179	9
HCl_FA	01/12/2011	0,20	2,85	0,14	859	73	4
	11/12/2011	0,23	3,00	0,15	836	78	7
	28/12/2011	0,20	2,95	0,13	850	62	4
	10/04/2012	0,21	2,41	0,11	865	175	4
	23/04/2012	0,20	3,15	0,13	878	162	5
Media HF_FA		0,22	3,32	0,12	846	149	8
Media HCl_FA		0,21	2,87	0,13	858	110	5

Anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	NS ²	NS	NS	NS	0,0063	NS
Fecha	4	NS	NS	NS	NS	0,0029	NS
Error (Ácido x Fecha)	4	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.1.2.4 Muestra de hoja de eucalipto

Para K, Na y Fe existió un efecto estadísticamente significativo de la técnica de digestión-disolución empleada (Cuadro No. 7). Sin embargo, para Ca, Mg y Zn el análisis de la varianza no reflejó diferencias significativas entre las técnicas de digestión-disolución empleadas. Existieron diferencias significativas entre fechas de análisis únicamente para K y Fe (Cuadro No. 7). El Ca fue el único elemento que mostró

un mayor porcentaje de recuperación con la técnica que incluyó HF+HNO₃, a pesar de no ser esta diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro No. 7. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de hoja de eucalipto. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- %-----			----- ppm-----		
HF_FA	01/12/2011	0,39	1,71	0,21	973	96	8
	11/12/2011	0,45	0,39	0,23	1094	81	9
	28/12/2011	0,40	0,41	0,22	941	87	10
	10/04/2012	0,44	0,78	0,22	990	155	18
	23/04/2012	0,42	0,93	0,23	985	102	13
HCl_FA	01/12/2011	0,37	0,70	0,25	875	70	11
	11/12/2011	0,43	0,81	0,24	860	48	11
	28/12/2011	0,41	0,78	0,22	861	64	4
	10/04/2012	0,41	0,74	0,21	970	145	12
	23/04/2012	0,39	0,82	0,22	957	83	11
Media HF_FA		0,42	0,84	0,22	997	104	12
Media HCl_FA		0,40	0,77	0,23	905	82	10

Anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	0,0705	NS ²	NS	0,0751	0,0043	NS
Fecha	4	0,0369	NS	NS	NS	0,0008	NS
Error (Ácido x Fecha)	4	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.1.2.5 Muestra de planta entera de maíz

Para K, Na y Fe existieron diferencias estadísticamente significativas en la técnica de digestión-disolución empleada, siendo las recuperaciones superiores con HF. En cambio, para Ca, Mg y Zn los valores obtenidos con las dos técnicas fueron similares

(Cuadro No. 8). Únicamente para K existieron diferencias significativas entre fechas de análisis.

Cuadro No. 8. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de planta entera de maíz. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- % -----			----- ppm-----		
HF_FA	23/05/2011	3,15	0,49	0,23	156	104	12
	17/08/2011	2,91	0,19	0,17	301	264	17
	25/10/2011	3,23	0,55	0,22	308	120	13
	01/12/2011	3,28	0,68	0,19	345	149	14
	11/12/2011	3,44	0,44	0,21	301	112	13
	28/12/2011	3,55	0,41	0,20	321	141	17
	10/04/2012	2,67	0,40	0,19	190	180	20
HCl_FA	23/05/2011	3,01	0,41	0,21	84	74	16
	17/08/2011	2,82	0,39	0,17	195	97	14
	25/10/2011	2,95	0,46	0,22	131	102	10
	01/12/2011	3,13	0,43	0,24	134	89	15
	11/12/2011	3,24	0,43	0,20	110	75	17
	28/12/2011	3,15	0,51	0,24	132	79	10
	10/04/2012	2,86	0,45	0,2	130	155	17
Media HF_FA		3,18	0,45	0,20	275	153	15
Media HCl_FA		3,02	0,44	0,21	131	96	14

Anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	0,0693	NS ²	NS	0,0009	0,0260	NS
Fecha	6	0,0238	NS	NS	NS	NS	NS
Error (Ácido x Fecha)	6	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.1.2.6 Muestra de tallos jóvenes de maíz de WEPAL

Al igual que en el caso anterior (planta de maíz), existieron para K, Na y Fe diferencias estadísticamente significativas en la técnica de digestión-disolución empleada; mientras que para Ca, Mg y Zn los valores obtenidos con las dos técnicas fueron similares (Cuadro No. 9). En este caso, en cambio, no existieron diferencias significativas entre fechas de análisis para ningún elemento.

Cuadro No. 9. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de tallos jóvenes de maíz de WEPAL. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- %-----			----- ppm-----		
HF_FA	01/12/2011	1,12	0,23	0,19	141	115	9
	11/12/2011	1,10	0,34	0,21	128	105	11
	28/12/2011	1,16	0,32	0,19	135	128	11
	10/04/2012	1,09	0,37	0,23	119	132	14
	23/04/2012	1,11	0,30	0,20	111	97	12
HCl_FA	01/12/2011	0,98	0,32	0,24	85	79	14
	11/12/2011	1,07	0,35	0,23	65	68	10
	28/12/2011	1,06	0,31	0,21	77	94	11
	10/04/2012	1,05	0,33	0,20	58	85	13
	23/04/2012	1,08	0,32	0,19	96	90	14
Media HF_FA		1,12	0,31	0,20	127	115	11
Media HCl_FA		1,05	0,33	0,21	76	83	12
Anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	0,0377	NS	NS	0,0049	0,0086	NS
Fecha	4	NS ²	NS	NS	NS	NS	NS
Error (Ácido x Fecha)	4	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.1.2.7 Muestra de sorgo de WEPAL

En este caso, para K, Ca, Na y Fe existieron diferencias significativas entre las técnica de digestión-disolución empleadas (Cuadro No. 10). En cambio, para Mg y Zn no existieron diferencias significativas entre las técnica; se puede ver también que los promedios calculados para estos dos elementos fueron similares en los dos tratamientos comparados. No existieron diferencias significativas entre fechas de análisis para ninguno de los cationes determinados (Cuadro No. 10).

Cuadro No. 10. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de sorgo de WEPAL. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- % -----			----- ppm -----		
HF_FA	01/12/2011	1,05	0,30	0,11	245	211	8
	11/12/2011	1,02	0,31	0,11	175	180	14
	28/12/2011	1,08	0,29	0,11	239	201	9
	10/04/2012	1,03	0,32	0,12	158	171	10
	23/04/2012	1,02	0,30	0,10	147	191	12
HCl_FA	01/12/2011	0,88	0,26	0,12	77	152	11
	11/12/2011	0,94	0,28	0,11	49	118	13
	28/12/2011	0,96	0,25	0,10	73	148	6
	10/04/2012	0,91	0,29	0,12	89	158	11
	23/04/2012	0,98	0,30	0,11	115	165	11
Media HF_FA		1,04	0,30	0,11	193	191	10,6
Media HCl_FA		0,93	0,28	0,11	81	148	10,4
anova							
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	0,0083	0,0189	NS	0,0141	0,0120	NS
Fecha	4	NS ²	NS	NS	NS	NS	NS
Error (Ácido x Fecha)	4	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.1.2.8 Muestra de alfalfa de WEPAL

Para K, Ca, Mg, Na y Zn no existieron diferencias significativas entre las técnica de digestión-disolución empleadas; solo existieron diferencias significativas para Fe (Cuadro No. 11). Existieron diferencias significativas entre fechas de análisis para Mg y Na.

Cuadro No. 11. Efecto del método de extracción (ME) y de la fecha de análisis en el resultado analítico de diferentes cationes para la muestra de alfalfa de WEPAL. (realizadas en FAGRO: FA).

ME	fecha	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- %-----			----- ppm-----		
HF_FA	01/12/2011	1,72	5,66	0,14	244	294	14
	11/12/2011	2,50	1,82	0,16	420	254	18
	28/12/2011	1,74	1,52	0,16	224	240	20
	10/04/2012	2,89	2,29	0,11	120	205	16
	23/04/2012	2,68	2,07	0,13	255	237	17
HCl_FA	01/12/2011	2,42	2,22	0,18	262	180	18
	11/12/2011	2,48	2,14	0,16	351	207	23
	28/12/2011	2,40	2,16	0,16	256	190	20
	10/04/2012	1,87	1,89	0,11	75	160	12
	23/04/2012	2,59	2,31	0,14	186	213	19
Media HF_FA		2,31	2,67	0,14	253	246	17
Media HCl_FA		2,35	2,14	0,15	226	190	18

		Anova					
F. V ¹ .	gl	----- valor de p -----					
ME	1	NS ²	NS	NS	NS	0,0212	NS
Fecha	4	NS	NS	0,0466	0,0080	NS	NS
Error (Ácido x Fecha)	4	No corresponde					

¹F. V. = Fuente de variación.

²NS=No significativo (p >0,10).

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 Limpieza de crisoles

Los resultados de los análisis de crisoles previamente usados evidenciaron que los mismos contenían residuos de cationes (Cuadro No. 3). Luego de analizar los resultados de la limpieza de los crisoles se vio que esta contaminación fue más importante para el caso de K y Fe.

4.2.2 Efecto de la técnica de digestión-disolución en el resultado analítico de las muestras analizadas

Los resultados analíticos en las dos muestras de arroz analizadas fueron similares, ya que en ambas existieron diferencias significativas entre las técnicas para K, Mg, Fe y Zn, pero no hubo diferencias en el caso de Ca y Na. De todas maneras en el caso de estos dos últimos elementos, los promedios calculados para Ca y Na fueron superiores cuando se utilizó HF (Cuadro No. 4 y 5).

Para el caso de las dos muestras de maíz el resultado analítico también fue similar ya que existieron diferencias significativas entre las técnicas para K, Na y Fe cuando fue usado HF. En cambio, los promedios para Ca, Mg y Zn fueron similares entre ambas técnicas.

En términos generales la muestra de sorgo de WEPAL tuvo un comportamiento similar a las muestras de maíz, ya que al igual que en el caso anterior las concentraciones de K, Na y Fe fueron mayores con el uso de la técnica de digestión-disolución con HF. Sin embargo, en contraste con el maíz, en la muestra de sorgo también existieron diferencias significativa para el Ca.

El grupo de muestras de las gramíneas y la hoja de eucalipto tuvieron resultados similares, pero las muestras de arroz, que tienen una mayor concentración de Si (aprox. 10%), tuvieron una diferencia aún mayor entre las técnicas. Los resultados de todas las muestras en forma conjunta indican que siempre existieron diferencias significativas entre las técnicas para Fe. Pero en cambio, si solo se consideran las muestras de gramíneas y la de hoja de eucalipto, los resultados revelan diferencias significativas para K y Fe.

Los resultados obtenidos para la muestra de corteza y hoja de eucalipto fueron diferentes; para la corteza existieron diferencias significativas entre las técnicas solo para Fe, mientras que en hojas existieron diferencias significativas para K, Na y Fe. Por tanto, estos resultados muestran que las hojas de eucalipto se comportaron de forma similar a las muestras de maíz y sorgo de WEPAL.

Por otra parte, los resultados de corteza de eucalipto coincidieron, en forma inesperada, con los de la muestra de alfalfa de WEPAL, ya que en esta última, solo existió diferencia para el caso de Fe. Esta similitud en los resultados entre corteza de eucalipto y alfalfa podría parecer casual, pero la misma puede ser explicada si se considera que ambas muestras tienen muy bajas concentraciones de Si. La concentración de Si reportado por WEPAL para la muestra de alfalfa fue de 0.14%, mientras que Hulme (2008) reportó para muestras de corteza de eucalipto concentraciones de Si de 0,10%.

Los resultados para la muestra de corteza de eucalipto y de alfalfa de WEPAL, concuerdan con las conclusiones a las que arribaron los investigadores Llimous y Fallavier (1996), Lamble y Hill (1998). Los primeros autores concluyeron que, cuando la muestra tiene un contenido de Si mayor a 3,5% las digestiones sin el uso de HF da resultados más bajos en la determinación de Ca, Mg y sobre todo en K, que si se usa HF en la digestión de la misma. Pero cuando la muestra tiene un contenido de Si menor a 3,5% el uso del HF en la disolución de las cenizas da resultados similares cuando es sustituido por otros ácidos. Como se vio, para el caso de la alfalfa de WEPAL y la corteza de eucalipto, el uso del HF más HNO_3 dio resultados similares al uso de HCl en la técnica digestión-disolución empleada.

En la Figura No.1 se presenta la diferencia entre los porcentajes de K obtenidos mediante las técnicas de HF_FA y HCl_FA, en función del porcentaje de Si de cada muestra. En dicha gráfica se observa que cuanto mayor es el contenido de Si en la muestra, mayor es la diferencia entre los porcentajes de K obtenidos por ambos métodos, o sea mayor es la desviación de un método con respecto al otro.

Para las muestras de arroz la diferencia en la determinación del porcentaje de K entre las técnicas de digestión-disolución fue de 0,27 a 0,33% de K. En tanto, para maíz (1 a 4% de Si) la diferencia entre las técnicas fue de 0,16%. El coeficiente de correlación (R^2) entre la diferencia de concentración de K en planta (%) y la concentración de Si en planta (%) fue de 0,896 (Figura No. 1). Los valores de concentración de Si en las

muestras fueron tomados de la bibliografía citada en la tesis. La concentración de Si en una muestra puede variar por distintos factores como ser: especie, etapa de crecimiento, órgano muestreado, tipo de suelo, etc.

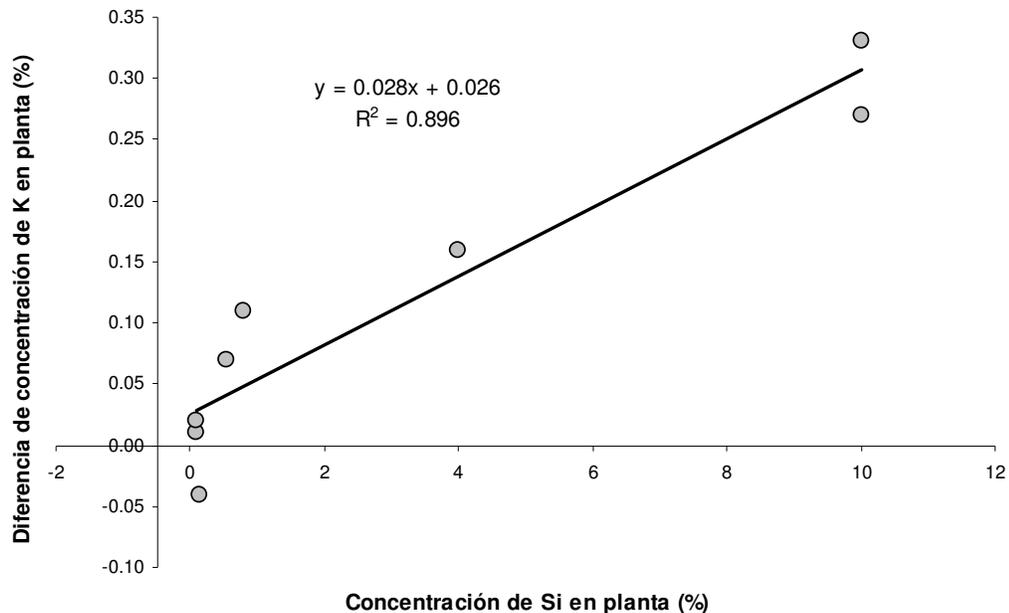


Figura No.1. Diferencia de concentración de K en planta entre las técnicas HF_FA y HCl_FA en función de la concentración de Si de la muestra.

4.3 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CATIONES DETERMINADOS CON HCl Y HF

Esta relación se estudió para dos variantes de la técnica de digestión-disolución obtenidas con HCl usada en Uruguay, que emplean FAGRO (HCl_FA) e INIA (HCl_INIA), pero en ambos casos el denominador de esta relación fue la concentración obtenida con HF.

4.3.1 Relaciones de concentración HCl/HF para las muestras de arroz I, arroz II, corteza de eucalipto, hojas de eucalipto y maíz

En el caso de arroz este cociente fue inferior a cien en ambas muestras para casi todos los cationes considerados, por lo cual la técnica de digestión-disolución con

HF_FA permitió obtener mayores porcentajes de recuperación que las otra dos basadas en HCl. La excepción fue el Zn, ya que la técnica con HCl_INIA incrementó su recuperación en un 18 y 14% para arroz I y II respectivamente (Cuadro No. 12). En el maíz, los porcentajes de recuperación con HF_FA resultaron superiores para K, Na y Fe. En cambio para el Ca, el porcentaje de recuperación obtenido con HCl_FA fue 3% superior, aunque 4% inferior cuando se usó HCl_INIA (Cuadro No. 12). El comportamiento del Zn fue similar, ya que el porcentaje de recuperación obtenido con HCl_FA fue 7% superior mientras que el obtenido con HCl_INIA fue 6% inferior.

La respuesta de Mg fue inversa a la del Ca, ya que el porcentaje de recuperación obtenido con HCl_FA fue 5% inferior al estimado usando HF, pero 6% superior al obtenido con HCl_INIA (Cuadro No. 12).

En la muestra de hoja de eucalipto, los porcentajes de recuperación obtenidos tanto con HCl_FA como con HCl_INIA fueron inferiores al 100%, o sea inferiores a las concentraciones obtenidas con HF, para la mayoría los elementos determinados. Las excepciones fueron el Mg, que con HCl_FA fue un 3% superior, y el Na que con HCl_INIA fue similar a la del HF (Cuadro No. 12).

Por último, en la muestra de corteza de eucalipto los valores de la relación HCl_FA/HF_FA fueron inferiores al 100% para K (95%), Ca (87%), Fe (74%) y Zn (60%). En cambio, para Mg este valor fue de 106% superior, mientras que para Na fue similar 101% (Cuadro No. 12). Con HCl_INIA estos valores fueron inferiores para Ca (94%), Fe (74%) y Zn (60%) pero superiores para K (183%), Mg (105%) y Na (378%) (Cuadro No. 12).

En resumen, los valores de concentración de K, Ca, Mg, Na y Fe obtenidos con HF en las dos gramíneas (arroz y maíz) y en la hoja de eucalipto fueron en general superiores a los obtenidos con las otras dos técnicas, aunque en algunas combinaciones muestra/nutriente la técnica HCl_INIA produjo valores ligeramente superiores a la del HF. En la muestra de corteza de eucalipto, en cambio, los resultados fueron más dispares, ya que la técnica HCl_INIA produjo valores mayores de concentración para K, Mg y Na. Una posible causa de esta diferencia podría ser la baja concentración de cationes de esta muestras, lo cual puede incrementar los errores relativos al comparar los resultados obtenidos de diferentes laboratorios. Además, esta muestra es la que tiene una baja concentración de Si, y en este tipo de muestras la técnica con HF no presentaría ventajas (Lamble y Hill, 1998).

En el caso de Zn, en cambio, no existieron ventajas por el uso de HF ni aun en muestras con alta concentración de Si. Este resultado pudo deberse a problemas instrumentales del Espectrofotómetro de Absorción Atómica de FAGRO que fueron específicas para este elemento. Por tanto, los resultados de Zn de FAGRO obtenidos tanto con HCl como con HF tienen mucha incertidumbre, lo cual impide realizar comparaciones válidas con el método de INIA.

Cuadro No. 12. Porcentajes de recuperación de cationes determinados con la técnica de HCl en relación a los resultados obtenidos con la técnica de HF, para dos variantes (FAGRO e INIA) de la primer técnica, obtenidos en distintos substratos vegetales.

Muestra	Fuente ¹	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- % -----					
Arroz I	HCl_FA ¹	80	80	92	86	69	67
	HCl_INIA	88	91	93	66	80	118
arroz II	HCl_FA	80	83	84	93	83	67
	HCl_INIA	101	101	82	95	93	114
maíz	HCl_FA	95	97	105	48	63	93
	HCl_INIA	92	104	94	36	51	106
H. de E. ²	HCl_FA	96	91	103	91	79	84
	HCl_INIA	90	86	90	100	61	86
C. de E. ³	HCl_FA	95	87	106	101	74	60
	HCl_INIA	183	94	105	378	58	34

¹HCl_FA y HCl_INIA: técnicas de determinación con HCl empleadas por estas instituciones. ² Hoja de eucalipto. ³ Corteza de eucalipto

4.3.2 Relaciones de concentración HCl/HF para las muestras de maíz, sorgo y alfalfa de WEPAL

Los resultados de las muestras suministradas por WEPAL analizadas con las técnicas HF_FA, HCl_FA y HCl_INIA se compararon con los resultados reportados por la propia WEPAL para esas mismas muestras, los cuales representan la media ajustada del ejercicio interlaboratorio (WEPAL, 2010). Según, Wepal, el ajuste de esa media se realiza en base a la modelación de los datos asumiendo una distribución normal que permite considerar toda la variación presente pero sin que los outliers afecten el resultado final. Cabe señalar que la variación de la información reportada por WEPAL no se debió solo a diferencias entre laboratorios que utilizaron la misma técnica, sino también a diferencias de procedimientos analíticos tanto a nivel de digestión-disolución

(distinto tipos de ácidos, incluyendo HF, HCl u otros ácidos) como de determinación (absorción atómica, plasma, cromatografía de gases, etc) usadas por ellos.

De acuerdo a lo reportado por WEPAL, en el caso de K el 34,0% de los laboratorios participantes utilizó como medio de digestión la conversión a cenizas por vía seca, el 52,0% utilizó digestión húmeda con o sin presurización, el 22,5% digestión con microondas, todos ellos sin HF, mientras que solo el 2,7% utilizó conversión a cenizas con HF (WEPAL, 2010). En el caso de Ca la distribución de técnicas fue similar, siendo los valores respectivos 30,7% cenizas por vía seca, 45,4% digestión húmeda, 21,3% microondas y 2,7% cenizas con HF. Por último en el caso de Zn la distribución de técnicas fue similar, siendo los valores respectivos 32,5% cenizas, 39,0% digestión húmeda, 23,4% microondas y 5,2% cenizas con HF.

Para la muestra de maíz, los resultados fueron variables; por un lado los porcentajes de recuperación con HF_FA con respecto al resultado reportado por WEPAL (considerado como 100%) fueron mayores para K (104%), Na (453%), y Fe (134%); en cambio, cuando se determinó Ca, Mg y Zn los porcentajes de recuperación fueron menores al 100%. En tanto, los porcentajes de recuperación con HCl_FA para K, Ca, Mg, Fe y Zn fueron inferiores al 100%, mientras que únicamente el Na fue superior (272%). Los porcentajes de recuperación para HCl_INIA fueron similares a los obtenidos para HCl_FA, inferiores al 100% para K, Ca, Mg, Fe y Zn y superior solo para Na (357%) (Cuadro No. 13).

En el caso de la muestra de sorgo, el uso de la técnica HF_FA fue también más eficiente. Los porcentajes de recuperación fueron superiores al 100% para K, Ca, Na y Fe, mientras que para el Mg fueron similares, y para el Zn fue 12% inferior, en base al valor reportado por WEPAL (Cuadro No. 13). En cambio, los porcentajes de recuperación calculados para HCl_FA en base a WEPAL fueron inferiores al 100% en cuatro de los seis elementos determinados, para K (97%), Ca (92%), Fe (90) y Zn (87%), mientras que para Mg (102%) y Na (252%) fueron superiores. En tanto, para HCl_INIA los porcentajes de recuperación calculados en base a WEPAL fueron inferiores al 100% para cinco de los seis cationes, K (92%), Ca (87%), Mg (82%) y Zn (92%), siendo superior para Na (313%) (Cuadro No. 13).

Por último, para la muestra de alfalfa, los porcentajes de recuperación calculados con HF_FA en base a los resultados reportados por WEPAL fueron menores al 100%, para K (89%), Mg (87%) y Zn (85%), pero superiores para Ca (117%), Na

(130%) y Fe (103%). Los porcentajes de recuperación calculados para HCl_FA y HCl_INIA fueron similares entre si y también inferiores a WEPAL para cinco de los seis elementos determinados (K, Ca, Mg, Fe y Zn) y superiores para el Na en ambos casos (Cuadro No. 13).

Cuadro No. 13. Porcentaje de recuperación de cationes determinados con las técnicas HF_FA, HCl_FA y HCl_INIA, en relación a los resultados obtenidos por WEPAL en distintos substratos vegetales.

Muestra	Técnica	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn
		----- % -----					
sorgo	HF_FA	108	101	100	603	116	88
maíz	HF_FA	104	87	93	453	134	71
alfalfa	HF_FA	89	117	87	130	103	85
sorgo	HCl_FA	97	92	102	252	90	87
maíz	HCl_FA	98	91	97	272	97	78
alfalfa	HCl_FA	90	94	93	116	80	92
sorgo	HCl_INIA	92	87	82	313	88	92
maíz	HCl_INIA	91	90	82	357	94	92
alfalfa	HCl_INIA	94	94	94	103	92	96

Por tanto, en maíz y sorgo HF_FA fue mayor a WEPAL para K, sin embargo, para HCl_FA e HCl_INIA los porcentajes de recuperación de K fueron inferiores. En el caso de Ca, HF_FA fue mayor para sorgo y alfalfa, en cambio el Ca determinado por HCl_FA e HCl_INIA siempre fue inferior a WEPAL. Para Mg los valores obtenidos con las técnicas HF_FA y HCl_FA fueron similares para el caso de sorgo, mientras que para el HCl_INIA los porcentajes de recuperación fueron siempre inferiores a WEPAL.

En tanto para Fe, HF_FA fue mayor en todas las muestras, en cambio para HCl_FA e HCl_INIA fue inferior a WEPAL en todos los casos, esto concuerda con lo encontrado por Lamble y Hill (1998); cuando compararon estándares de muestras medioambientales la técnica con HF siempre determinaba mayores valores de Fe. Para Zn la técnica HF_FA siempre dio menor a WEPAL, no obstante el INIA obtuvo resultados cercanos, lo cual confirma la existencia de un problema sistemático de determinación de Zn en FAGRO. En el caso de Na, los resultados de FAGRO e INIA sobrestimaron los de WEPAL en forma muy marcada, no existiendo una explicación clara al respecto.

Los porcentajes de recuperación de K, Ca, Mg y Fe con las técnicas HF_FA y HCl_FA con respecto a WEPAL fueron de 66,7% y 8,3% respectivamente (Cuadro No. 13). Además, en el caso de HF_FA, el 33,0% de estos resultados fue mayor a 110%. En tanto, para la técnica HCl_INIA en ningún caso los porcentajes de recuperación superaron el 96,0% de lo reportado por WEPAL. En estas estimaciones no se consideraron los resultados de Na obtenidos por ninguna de las técnicas evaluadas (HF_FA, HCl_FA y HCl_INIA) ni los de Zn de FAGRO (HF_FA y HCl_FA) ya que en estos casos los mismos fueron siempre superiores (Na) o inferiores (Zn) a lo reportado por WEPAL, evidenciando un error sistemático (Cuadro No. 13).

Estos resultados también muestran que las metodologías HCl_FA y HCl_INIA tendieron a dar resultados inferiores a WEPAL en todas las matrices para K, Ca, Mg, así como para Mg en sorgo. Mientras que la técnica de HF_FA fue inferior a WEPAL en el caso de Zn y Mg en maíz y alfalfa, Ca en Maíz y K en alfalfa. Por tanto, los procedimientos usualmente utilizados para analizar muestras vegetales en Uruguay tendieron a dar resultados inferiores a los considerados como correctos por WEPAL, y la mayoría se encontró dentro del rango de los outliers. Esto no ocurrió en cambio para la mayoría de los resultados obtenidos con HF_FA.

4.3.3 Efecto de la temperatura de secado en el porcentaje de materia seca (MS) de seis muestras de especies diferentes

Debido a que las temperaturas de secado reportadas por WEPAL (70°C) diferían de las utilizadas tanto en INIA como en FAGRO (60°C), se realizó un ensayo para comparar el efecto de la temperatura de secado en el porcentaje de materia seca (MS) de seis muestras de especies diferentes. Este dato se utiliza luego como base para determinar la concentración de nutrientes. Las muestras se secaron durante cuatro horas, posteriormente se calculó el porcentaje de MS de cada material y la relación % MS 70 /60 °C (Cuadro No. 14). La mayoría de estas muestras eran de origen nacional y la restante de WEPAL.

Cuadro No. 14. Porcentaje de MS obtenido con dos temperaturas de secado (60 y 70 °C) y relación de MS obtenida a estas dos temperaturas en seis muestras de planta.

Muestra	MS 60 (%)	MS 70 (%)	MS 70/60 ¹
arroz I	94,5	92,0	97
arroz II	93,2	92,0	99
maíz	91,9	91,1	99
H de E ²	94,8	93,3	98
C de E ³	93,0	92,2	99
alfalfa WEPAL	94,0	93,5	99

¹Relación de MS obtenida a 70 y a 60 °C

² Hoja de eucalipto. ³ Corteza de eucalipto

Los resultados indican que la diferencia de 10°C en la temperatura de secado produjo pérdidas adicionales de agua entre 0,5 y 2,5%, y relaciones de entre 97 y 99% en el porcentaje de MS obtenido. Pero estas pérdidas adicionales de humedad no permiten explicar las diferencias en las concentraciones de nutrientes observadas entre las técnicas de Uruguay y los resultados de WEPAL: A modo de ejemplo, en la muestra de alfalfa de WEPAL la diferencia en K con HCl_FA fue de 0.25% a favor de WEPAL, y cuando se corrigió por temperatura de secado esta diferencia bajó solo a 0.24%.

5. CONCLUSIONES

La técnica de digestión con HCl utilizada por los dos laboratorios de Uruguay evaluados en este trabajo (FAGRO e INIA) tiende a subestimar la concentración de algunos macro (K y Ca) y micronutrientes (Fe y Zn) de tejidos vegetales, debido a formación de compuestos minerales entre estos elementos y el Si. Esta subestimación es máxima para el caso del K. Por consiguiente, para obtener mayores porcentajes de recuperación se debería usar otra técnica de digestión-dilución, ya sea usando HF como la propuesta en este trabajo, o algunas de las otras utilizadas por los laboratorios que reportan a WEPAL, como ser digestión húmeda con o sin presión o digestión con microondas. La importancia de utilizar métodos alternativos como la digestión con HF va a ser mayor en las muestras con altos contenidos de Si, como por ejemplo el arroz.

Para utilizar la técnica con HF se debe tener especial cuidado en limpiar previamente los crisoles con HF más HNO₃, como se indica en esta tesis. Esta limpieza remueve la contaminación, por restos minerales de K y Fe, existente en crisoles usados previamente para realizar digestiones con HCl.

El 67% de los resultados de los análisis realizados con la técnica de digestión con HF fueron coincidentes o mayores a los reportados por WEPAL en análisis interlaboratorios realizados a nivel mundial (WEPAL, 2010). En cambio, para la técnica de HCl_FA este porcentaje igual o superior a WEPAL fue de solo 8,3% y en la de HCl_INIA fue de 0%.

6. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar dos técnicas de digestión-disolución, previa conversión de la muestra a cenizas, para la determinación de minerales en tejidos vegetales. En una se utilizó HCl para la disolución y en la otra se utilizó HF más HNO₃. Los elementos determinados fueron: K, Ca, Mg, Na, Fe y Zn. Para la comparación se utilizaron tejidos vegetales de alfalfa, arroz, eucalipto (corteza y hoja), maíz y sorgo. Una sub muestra de cada una fue enviada al INIA La Estanzuela para su comparación con los resultados obtenidos en el Laboratorio de FAGRO. Se realizaron Anovas comparando las dos técnicas de digestión-disolución. Para las muestras de arroz I y II, se encontraron diferencias significativas entre las técnicas de digestión-disolución HF_FA y HCl_FA para K, Mg, Fe y Zn, siendo superiores los promedios obtenidos con la técnica HF_FA. En las muestras de maíz, en sorgo y hojas de eucaliptos existieron diferencias significativas para K, Na y Fe. En las muestras de corteza de eucalipto y alfalfa se encontraron diferencias significativas solo para Fe. El coeficiente de correlación (R²) de la diferencia de concentración de K en planta y la concentración de Si en planta fue de 0,896. Para el arroz, los porcentajes de recuperación de cationes determinados con las técnicas de HCl (en FAGRO e INIA) en relación a los resultados obtenidos con la técnica de HF fueron inferiores al 100 % para todos los cationes (a excepción del Zn determinado en INIA). En el caso de las muestras de WEPAL los porcentaje de recuperación de K Ca y Mg y Fe fueron mayores o similares con el uso de HF. Estos resultados indican que las metodologías actualmente utilizadas para digerir muestras vegetales basadas en HCl tienden a subestimar la concentración de K, Ca, Mg, Fe y Zn, pero este problema es aun mayor para K en muestras con alto contenido de Si como el arroz. El uso de la técnica basada en conversión a cenizas y posterior digestión-disolución con HF más HNO₃ permite en cambio obtener resultados comparables a los considerados como de referencia por el Instituto WEPAL de la Universidad de Wageningen (Países Bajos).

Palabras clave: Conversión a cenizas; Digestión-Disolución; Silicio; Ácido fluorhídrico; Ácido clorhídrico; Determinación de minerales.

7. SUMMARY

The present work was designed to compare two techniques of digestion-dissolution after conversion of the sample to ashes, for the determination of minerals in plant tissues. In one technique, HCl was used to dissolve and in the other technique was used HNO₃ and HF. The elements determined were: K, Ca, Mg, Na, Fe and Zn. The plant tissues compared were alfalfa, rice, eucalyptus (bark and leaf), maize and sorghum. A sub sample of each one was sent to the INIA La Estanzuela for comparison with the results obtained in the Fagro's Laboratory. ANOVAS were performed comparing the two digestion-dissolution techniques. Considering rice samples I and II, the techniques, digestion-dissolution HF-FA and HCl-FA had significant differences for K, Mg, Fe and Zn, where the averages obtained with the technique HF-FA were higher than the technique HCl-FA. In samples of corn, sorghum and eucalyptus leaves there were significant differences for K, Na and Fe. There were significant differences only for Fe in the samples of alfalfa and eucalyptus bark. The correlation coefficient (R^2) of the difference plant K concentration and Si concentration was 0.896. The cations recoveries percentages for rice determined with the techniques of HCl(in FAGRO and INIA) were less than 100% in relation to the results obtained with the technique of HF (an exception was Zn determined in INIA). In the case of WEPAL samples, the recoveries percentages of K, Ca, Mg and Fe were greater than or similar to the use of HF. These results indicate that the methods currently used to digest plant samples based on HCl tend to underestimate the concentration of K, Ca, Mg, Fe and Zn, but this problem is even greater for K in samples with high Si content as rice. Instead, the use of the technique based on ash and subsequent digestion-dissolution with HF and HNO₃ allows results comparable to those considered as reference by WEPAL Institute at the University of Wageningen (Netherlands).

Keywords: Conversion to ashes; Digestion-dissolution; Silicon; Hydrofluoric acid; Hydrochloric Acid; Minerals determination.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALCANTAR, G.; TREJO-TÉLLEZ, L. 2009. Nutrición de cultivos. México, D. F., Mundi-Prensa.454 p.
2. AL-HARAHSEHA, M.; KINGMAN, S.; SOMERFIELD, C.; ABABNEH, F. 2009. Microwave-assisted total digestion of sulphide ores for multi-element analysis. *Analytica Chimica Acta*. 638: 101–105
3. BARBAZÁN, M.1998. Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Montevideo, Facultad de Agronomía. 27 p.
4. BATAGLIA, P. 1983. IAC. Digestión por vía seca. INIA La Estanzuela Boletín Técnico No. 78. 9 p.
5. EPSTEIN, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (1): 11-17.
6. GAUDINO S.; GALAS, CH.; BELLI, M.; BARBIZZI, S.; DE ZORZI, P.; JACIMOVIC, R.; JERAN, Z.; PATI, A.; SANSONE, U. 2007. The role of different soil sample digestion methods on trace elements analysis; a comparison of ICP-MS and INAA measurement results. *Accreditation and Quality Assurance*. 12 (2): 84-93.
7. HECKMAN, J. R. 2012. The soil profile. Rutgers. New Jersey Agricultural Experiment Station. Newsletter v. 9. 12 p.
8. LAMBLE, K. J.; HILL, S. J. 1998. Microwave digestion procedures for environmental matrices; critical review. *Analyst*. 123: 103-133.

9. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações, 2ª ed. San Pablo, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 209 p.
10. MILLAN, E.; ABADÍA, A. 1981. Comparación de distintos procedimientos analíticos para la determinación de Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, y Zn en material vegetal. *Anales Aula Dei*. 15 (3-4): 332-342. Consultado ago. 2012. Disponible en [http://digital.csic.es/bitstream/10261/14158/1/ANALES_15_3-4-Comparacion de distintos procedimientos.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/14158/1/ANALES_15_3-4-Comparacion_de_distintos_procedimientos.pdf)
11. NOVOZAMSKY, I.; VAN DER LEE, H. J.; HOUBA, V. J. G. 1995. Sample digestion procedures for trace element determination. *Mikrochimica Acta*. 119: 183-189.
12. POYKIO, R.; PERAMAKI, P. 2003. Acid dissolution methods for heavy metals determination in pine needles. *Environmental Chemistry Letters*. 1: 191-195.
13. SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. 2000. *Fisiología de las plantas*. Madrid, Paraninfo. 988 p.
14. SKOOG, D.; LEARY, J. 1994. *Análisis instrumental*. 4ª ed. Madrid, McGraw-Hill. 935 p.
15. SOIL AND PLANT ANALYSIS COUNCIL 1998. *Soil analysis; handbook of reference methods for plants analysis*. Boca Raton, FL, CRC. 300 p.

16. WAGENINGEN EVALUATING PROGRAMS FOR ANALYTICAL LABORATORIES. 2010 International Plant-Analytical Exchange. Annual Report. 2010. 114 p. Consultado abr. 2011. Disponible en <http://www.wepal.nl/website/products/AnnualReport.htm>

17. _____. 2011. International Plant-Analytical Exchange. Annual Report. 2011. 117 p. Consultado jun. 2012. Disponible en <http://www.wepal.nl/website/products/AnnualReport.htm>