

PRODUCCIÓN Y CERTIFICACIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA PARA EL SECTOR AGRÍCOLA

Francisco Segoviano R. / María Elena García A.
Metrología de Materiales Centro Nacional de Metrología,
Apdo. Postal 1-100, Centro, Querétaro, Qro. México 76000,
Tel: (52)442-2110560, Fax: (52)442-2110569. fsegovia@cenam.mx / mgarcia@cenam.mx.

Resumen: El Material de Referencia de Hojas de Maíz fue desarrollado y certificado en concentración de Fósforo, en respuesta a requerimientos de los laboratorios dedicados a las mediciones químicas del sector agrícola. En este estudio se optimizaron los procesos de molienda y pulverización. Para el tratamiento del material se utilizaron dos métodos de digestión, el primero fue placa digestora usando mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico, el segundo fue digestión por microondas seguido de digestión con sistema abierto utilizando ácido nítrico y perclórico. Se agregó ácido fluorhídrico para disolver el precipitado presente de silicio. Para la certificación se emplearon las técnicas analíticas espectrofotométricas de ICP-OES, ICP-MS y UV-VIS.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un Material de Referencia de hojas de maíz y su certificación, son consecuencia de las necesidades de los laboratorios dedicados al análisis de suelos y de plantas con fines de evaluar la fertilidad de suelos y será utilizado para armonizar los métodos de medición, mejorar la calidad de medición e incrementar la confiabilidad de las mediciones en este tipo de materiales, así como para establecer trazabilidad al Sistema Internacional de Unidades.

De las reuniones realizadas por el CENAM, en los seminarios del sector agrícola en donde participaron varios laboratorios del país, se identificó la necesidad de tener materiales de referencia nacionales de tejido vegetal. De estas reuniones se identificaron varios parámetros de interés prioritaria como son elementos denominados macronutriente y micronutriente.

Siendo éstos elementos de gran interés para la fertilidad de los suelos agrícolas del país, se eligió como primer parámetro de certificación al Fósforo ya que es considerado un macronutriente.

DESARROLLO

Tipo de material

Se escogió un cultivo de maíz criollo del ciclo otoño/invierno. Se seleccionaron las hojas inmediatamente abajo del verticilo de la planta en su etapa previa al espigamiento.

La recolección de las hojas se realizó cada cinco hileras, en cada hilera a cada diez pasos se recolecto una hoja, hasta obtener 14 kg en una superficie de 2,5 hectáreas.

Limpieza del Material Candidato.

El lavado de las hojas se realizó con solución de HCl 0,1 mol/L, enseguida se enjuagó con agua destilada y desionizada.

El proceso de secado del material se realizó exponiéndolo directamente al sol sobre un plástico en piso de cemento en un lugar libre de polvo por 3 días, realizando movimientos ocasionales de las hojas para su exposición al sol por ambos lados.

El Proceso de secado exhaustivo se realizó en un horno de acero inoxidable a 72 °C durante 48 h aproximadamente.

Molienda y tamizado.

El Proceso de molienda se realizó en un molino de acero inoxidable, para obtener el material a un tamaño de partícula de 425 µm (malla 40), posteriormente se tamizó a un tamaño de partícula de 250 µm (malla 60) y se obtuvieron 5 kg.

Finalmente el material a 250 µm se tamiza a un tamaño de partícula de 75 µm (malla 200) del cual se obtuvo aproximadamente 340 g de material. El tamaño de partícula se optimizó a aproximadamente

75 μm debido a que a tamaños de partícula mayores no se garantiza la homogeneidad del material.

Homogeneización y envasado.

La muestra se dividió y homogeneizó en ocho partes iguales en un vibrador y divisor "rifler", a su vez, cada una de las ocho muestras se subdividió y homogeneizó en ocho muestras de igual peso en un micro divisor. En esta última etapa, se realizó la transferencia del material a los frascos de envasado final y se dejó en luz ultravioleta visible por 15 minutos; inmediatamente después se cerraron los frascos, se sellaron y se empacaron produciendo un lote de 64 unidades de aproximadamente 5 g cada uno. El material de referencia ya envasado fue identificado como DMR 162a.

Se realizó la medición de tamaño de partícula para asegurar la homogeneidad de la muestra, obteniéndose un tamaño de partícula de 133,31 μm a un 90% de volumen acumulado. (Tabla I). El tamaño de partícula se midió en un equipo Láser Malvern Mastersizer con una lente de 300 mm.

Moda	10%	50%	90%
78,25 μm	19,87 μm	70,86 μm	133,31 μm

Tabla I Tamaño de partícula (μm) a un volumen acumulado de %

PREPARACIÓN DE MUESTRA

Determinación de Humedad

La humedad del DMR 162a se midió con el método gravimétrico, utilizando 0,5 g de muestra en un desecador con perclorato de magnesio como agente desecante, por aproximadamente 120 h a temperatura ambiente hasta llevar a peso constante.

Digestión del material

Se emplearon dos tipos de digestión para evaluar la disolución del fósforo presente en diferentes tipos de ácidos. Todas las operaciones de dilución de muestra fueron realizadas por peso

empleándose una balanza Mettler AT400 con una resolución de 0,1 mg, para mejorar la incertidumbre de la medición.

1. Digestión en Placa digestora

Este método consiste en hacer una digestión ácida a reflujo en tubos de borosilicato.

Se empleó 6 mL de una mezcla de HNO_3 y HClO_4 grado reactivo en relación 2:1 (v/v) y se llevó a predigestión dejando las muestras en reposo por 12 horas.

Posteriormente la mezcla se colocó en una placa digestora y se aplicó una temperatura de 150 °C a eliminación de humos de óxido nítrico durante 45 min, en esta etapa se digiere la materia orgánica e inorgánica presente. Para la eliminación total de la materia orgánica se incrementó la temperatura a 210 °C durante 30 minutos, en esta etapa se presentan humos blancos densos los cuales comenzaron a la temperatura de 203 °C, correspondientes al punto azeotrópico, el cual marca el final de la reacción. Se agregaron unas gotas de HF para disolver y eliminar el precipitado de silicio como SiF_4 , posteriormente se aforó a 25 mL. Al mismo tiempo con las muestras se digirieron blancos y Material de Referencia Certificado SRM 1515 de hojas de manzano utilizado como control.

2. Digestión por microondas

Este método consiste en realizar una digestión en sistema cerrado por microondas.

Se pesó 0,5 g de muestra se utilizaron vasos de teflón para microondas, se emplearon 12 mL de HNO_3 y se aplicó el programa de digestión con los parámetros mostrados en la tabla II, ya que las muestras contienen una gran concentración de ácido, la muestra se termina de digerir en sistema abierto donde se transfiere la muestra a vasos de precipitados de teflón para evaporar el exceso de ácido nítrico a una temperatura entre 100 a 120 °C. Debido a que el silicio presente no se disolvió al final de esta digestión, se adicionan 0,5 mL de HClO_4 para la eliminación total de la materia orgánica presente y 3 gotas de HF para la disolución y eliminación del silicio, se llevaron a digestión hasta reducir el volumen de solución aproximadamente 1 mL. Se llevó a una segunda etapa de digestión en sistema abierto con la finalidad de asegurar la digestión total de la materia orgánica presente, agregando 3 mL de HNO_3 - HClO_4 (2:1) y se llevó a evaporación hasta 1 mL

aproximadamente, posteriormente se aforó la muestra a 25 mL.^[6]

Etapas	1	2	3	4	5
% Poder	25	66	66	66	66
Presión (psi)	20	40	80	150	190
Tiempo (s)	10	10	10	10	10
Permanencia (s)	5	5	5	5	7

Tabla II Parámetros de Digestión por Microondas

MEDICIÓN DE MUESTRAS

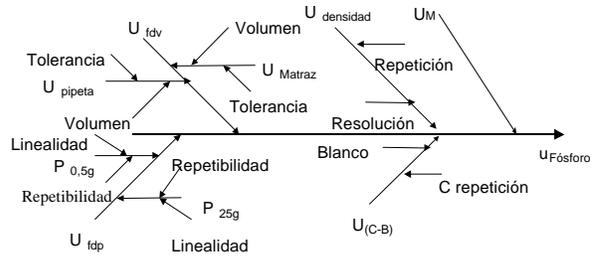
El contenido de Fósforo en hojas de maíz se midió por las técnicas de Espectrometría de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y Espectrofotometría de Ultravioleta Visible (UV-VIS).

Se utilizó la solución espectrométrica de fósforo SRM 3139a con valores de 9,9 mg/g ± 0,04 mg/g para realizar la curva de calibración y el Material de Referencia Certificado SRM 1515 de hojas de manzano el cual fue utilizado como control .

Espectrofotometría Ultravioleta visible.

Para la medición de Fósforo se utilizó un Espectrómetro Perkin Elmer, Lamda 19 de doble haz, a una longitud de onda de 470 nm utilizando celdas de cuarzo, el fósforo se midió utilizando el método de vanadomolídico, con calibración externa utilizando el SRM 3139a para fósforo. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la concentración y el diagrama de causa efecto para la estimación de incertidumbre en la medición de fósforo por el método de espectrofotometría ultravioleta visible, se muestran en la ecuación y diagrama 1.

$$Cm_p = C_{(C-B)} * fdv * fdp * \left(\frac{1}{M}\right) * \left(\frac{1}{r}\right)$$



Ecuación y Diagrama 1

Donde:

Cm_p = Concentración de fósforo en la muestra

$C_{(C-B)}$ = Concentración de la muestra de la curva de calibración menos el blanco)

fdv = Factor de la dilución realizada por volumen

fdp = Factor de dilución del primer aforo por peso

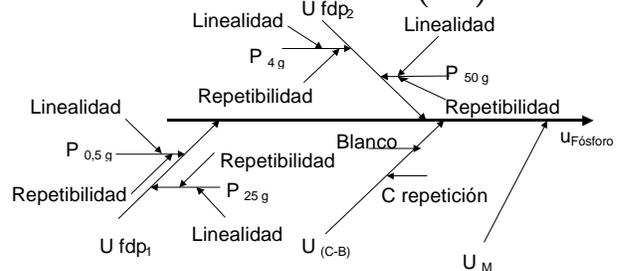
M = Peso atómico de fósforo.

ρ = Densidad de la solución

Espectrometría de Emisión Acoplado a Plasma Inductivamente (ICP-OES)

Para la medición de fósforo se utilizó el instrumento TermoElemental Iris Intrepid, a una longitud de onda de 178,2 , empleándose un poder de radiofrecuencia de 1150 W. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la concentración y el diagrama de causa efecto para la estimación de incertidumbre en la medición de fósforo por el método de Espectrometría de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), se muestran en la ecuación y diagrama 2.

$$Cm_p = C_{(C-B)} * fdp_1 * fdp_2 * \left(\frac{1}{M}\right)$$



Ecuación y Diagrama 2

Donde:

Cm_p = Concentración de fósforo en la muestra

$C_{(C-B)}$ = Concentración de la muestra de la curva de calibración menos el blanco)

$Fdp1$ = Factor de dilución del primer aforo por peso

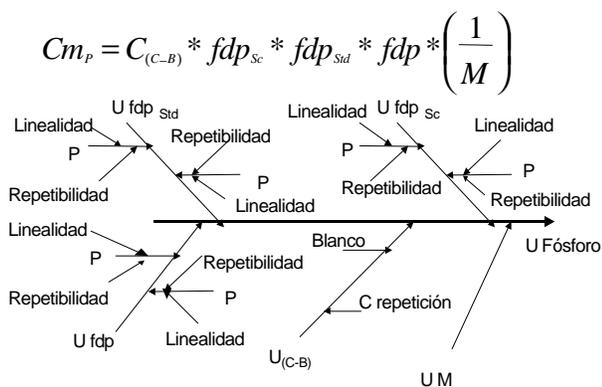
$Fdp2$ = Factor de dilución del segundo aforo por peso

M = Peso atómico de fósforo.

Espectrometría de Masas de alta resolución con Plasma acoplado Inductivamente (HR-ICP-MS)

Para la medición de fósforo, se empleó un HR-ICP-MS Finnigan Mat Element 1, Modelo 3598; con un poder RF de 1300W, se empleó media resolución, se realizó calibración con estándar interno, para lo cual se utilizó el material de referencia de escandio HPS. Las masas medidas fueron la siguientes: P31, y Sc45.

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la concentración y el diagrama de causa efecto para la estimación de incertidumbre en la medición de fósforo por el método de Espectrometría de Masas de alta resolución con Plasma acoplado Inductivamente (HR-ICP-MS), se muestran en la ecuación y diagrama 3.



Ecuación y Diagrama 3

Donde:

Cm_p = Concentración de fósforo en la muestra

$C_{(C-B)}$ = Concentración de la muestra de la curva de calibración menos el blanco)

$Fdp1$ = Factor de dilución por peso

$FdpSc$ = Factor de dilución del estándar interno por peso

$Fdp std$ = Factor de dilución del estándar utilizado para la curva de calibración por peso

M = Peso atómico de fósforo.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Durante el desarrollo de la digestión total de muestra nos encontramos que es muy importante adicionar la cantidad adecuada de ácido fluorhídrico, ya que por placa digestora se observó que al no adicionarse suficiente ácido fluorhídrico se forma un precipitado fino color blanco, en cambio el exceso de dicho ácido en la digestión por microondas forma un precipitado blanco gelatinoso. Los precipitados fueron medidos por el Espectrómetro de discriminación de energía de rayos X acoplado a microscopio de barrido con electrones, corroborando que el precipitado obtenido en placa digestora estaba formado principalmente de silicio, en cambio el precipitado obtenido en la digestión por microondas estaba constituido principalmente por calcio y en menor cantidad por magnesio y aluminio.

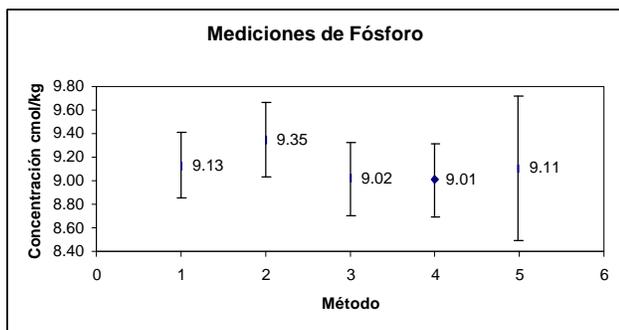
Cabe mencionar que en las muestras digeridas en microondas no fue posible realizar la medición de fósforo por espectrofotometría UV-Vis debido a que la muestra presenta una coloración amarilla que interfiere con el color desarrollado en el complejo para la medición.

En la tabla III y gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos de la medición de Fósforo para los diferentes métodos de medición empleados, donde se observa que la incertidumbre propuesta cubre todos los valores de medición obtenidos así como sus incertidumbres individuales asociadas.

Ubicación	Digestión	Método	Valor cmol/kg	U cmol/kg*	U Rel.
1	PD	UV-VIS	9,13	0,28	3,0
2	PD	ICP-OES	9,35	0,32	3,4
3	MO	ICP-MS	9,02	0,31	3,5
4	MO	ICP-OES	9,01	0,31	3,4

*cmol/kg = centimol/kilogramo

Tabla III DMR 162a (Fósforo en tejido vegetal)



Gráfica I. Resultados en diferentes métodos de medición de fósforo.

En la tabla VI se reporta el valor de certificación para Fósforo en Hojas de Maíz, el cual fue calculado tomando en cuenta todos los métodos de digestión y medición realizados ya que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

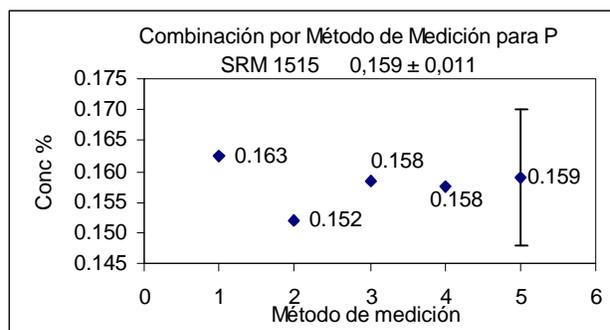
Analito	Valor (cmol/kg)	U (cmol/kg)	U relativa
Fósforo	9,11	0,61	6,7

Tabla VI Valores sugeridos de Certificación para el DMR 162a (Tejido Vegetal, Hojas de Maíz)

En la Tabla VII y gráfica II se muestran los valores del Material de Referencia utilizado como control (SRM 1515 0,159 ± 0,011 % peso de Hojas de manzano), el cual para las diferentes técnicas empleadas se obtuvieron valores que se encuentran en el intervalo de incertidumbre del SRM por lo que se aseguran los valores medidos en las diferentes metodologías.

Ubicación	Digestión	Método	Valor %
1	PD	UV-VIS	0,163
2	PD	ICP-OES	0,152
3	MO	ICP-MS	0,158
4	MO	ICP-OES	0,158
5	Valor Certificado		0,159 ± 0,011

Tabla VII Valores de Fósforo medidos en el material de Referencia SRM 1515.



Gráfica II. Resultados del Material de Referencia utilizado como control (SRM 1515) en diferentes métodos de medición de fósforo.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado y certificado un material de referencia de tejido vegetal de hojas de maíz para Fósforo el cual va a contribuir en el aseguramiento de la calidad de las mediciones realizadas en P por laboratorios tanto de investigación como de servicios que realicen mediciones en matrices similares a dicho material.

Es necesario que las mediciones sean realizadas en muestras de disolución completa, ya que la presencia de sólidos suspendidos ocasiona problemas de ruido instrumental en los instrumentos de medición principalmente al paso del haz por la celda de cuarzo, afectando principalmente la precisión de las mediciones.

Así también los valores reportados del SRM 1515 por el método de microondas y las técnicas de medición ICP-OES e ICP-MS presentan un mejor nivel de exactitud y precisión que los valores obtenidos por el método de digestión en placa digestora y las técnicas de medición ICP-OES y UV-VIS.

Las metodologías empleadas para la medición de Fósforo son recomendadas, ya que no muestran diferencias en los métodos de digestión.

Los resultados del material de control SRM1515 fueron reproducibles en las metodologías empleadas.

El método más utilizado por los laboratorios es el de Espectrofotometría UV-Vis, sin embargo para asignar el valor e incertidumbres sugerido se emplearon las tres metodologías para que cualquiera de éstas puedan ser utilizadas en la medición de este tipo de material.

La certificación de los demás elementos denominados macronutrientes y micronutrientes serán certificados en la misma matriz en un futuro cercano.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge D. Etchevers B, M en C Rosa Ma. López R. del Colegio de Postgraduados, por su entusiasta y valiosa participación en el desarrollo de este material de referencia, así como al personal del INIFAP y CEHUI que colaboraron con el CENAM en el desarrollo de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] National Institute of Standards and Technology, Certificate of Analysis, Standards Reference Material 1515 (Apple Leaves) 1993.
- [2] National Institute of Standards and Technology, Reference Material 8412 (Corn Stalk) 1994.
- [3] National Institute of Standards and Technology, Certificate of Analysis, Standards Reference Material 1547 (Peach Leaves) 1993
- [4] R. Mavrodineanu and R. Alvarez, National Institute of Standards and Technology, Special Publication 260-104 Standards Reference Materials, Summary of the Biological and Botanical Standards Issued by the National Bureau of Standards, Standards Reference Material 1547 (Peach Leaves) 1993.
- [5] Robert R. Grennberg, H.M. Kingston, Robert L. Watter, Jr., and Kenneth W. Pratt. Dissolution problems with botanical reference materials, Fresenius J. Anal Chem, 338. 1990, 394-398.
- [6] Rajananda Saraswati, Thomas W. Vetter and Robert L. Watters, Jr. Comparison of Reflux and Microwave Oven Digestion for the Determination of Arsenic and Selenium in Sludge Reference Material Using Flow Injection Hydride Generation and Atomic Absorption Spectrometry, Analyst, 120. January 1995, 95-99.
- [7] Manual de procedimientos analíticos para análisis de suelos y plantas de laboratorio de fertilidad de suelos. IRENAT-Colegio de Postgraduados, ISP.