

C. ALVAREZ HERRERO
M. P. BAURA DE LA PEÑA
M. I. DIAZ-GÜEMES PÉREZ
F. J. DIAZ RODRIGUEZ
J. FERNÁNDEZ FRÍAS
R. GALLEGU ANDRÉU
G. MIGUEL CÁRDABA

Sección de Espectroanálisis,
Departamento de Química Analítica del C.S.I.C.
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense, Madrid



DETERMINACION ESPECTROQUÍMICA DE MICRONUTRIENTES EN GRANO DE TRIGO

Se ha puesto a punto un método para determinar espectroquímicamente micronutrientes (Fe, Mn, Mo y Zn), en granos de trigo, utilizando como técnica analítica la espectroscopía de emisión atómica. Las muestras se someten previamente a un proceso de digestión con HNO_3 y HClO_4 concentrados. Con el objeto de mejorar la sensibilidad del método, los micronutrientes se extraen, a $\text{pH} = 5,0 \pm 0,3$, con ácido 1-pirrolidinditiocarboxílico (PDTCH) al 2% en cloroformo. Los complejos formados se calcinan a 450°C , y se analizan espectroquímicamente, utilizando como patrón interno óxido de tántalo (Ta_2O_5), en proporción 1:1. La sensibilidad media del método es 1 ppm, y su precisión 10-15%. El método propuesto nos permite conocer, pues, rápida y simultáneamente, los niveles de concentración de dichos elementos en plantas, y nos capacita para diagnosticar su estado nutricional.

INTRODUCCION

El objeto del presente trabajo es poner a punto un método de análisis, por vía espectroquímica, para la determinación de Fe, Mn, Mo y Zn en muestras vegetales.

La importancia que poseen los micronutrientes en el desarrollo de las plantas es enorme, y se pone de manifiesto por las alteraciones histológicas y morfológicas que su deficiencia provoca. Su presencia es fundamental en procesos tan importantes como: respiración, fotosíntesis, metabolismo, integración en numerosos sistemas enzimáticos, asimilación del nitrógeno, etc.

Este análisis se ha complementado con el estudio de la posible influencia de varios parámetros, tales como: variedad de trigo, tipo de suelo, grado de abonado en fósforo y peso de la espiga.

Se ha seleccionado como técnica analítica la espectroscopía de emisión atómica por su notable sensibilidad, exención casi total de interferencias, reproducibilidad aceptable, y posibilidad de realizar determinaciones cuantitativas simultáneas.

Considerando las pequeñas concentraciones en que se encuentran estos elementos en el material en estudio, ha sido necesario someter las muestras a un proceso de concentración previo. Las muestras primero se mineralizan mediante digestión con ácidos concentrados (HNO_3 y HClO_4), procediendo a la separación de los micronutrientes seleccionados, mediante extracción con ácidos 1-pirrolidinditiocarboxílico (PDTCH) en cloroformo, a $\text{pH} = 5,0 \pm 0,3$. En tales condiciones está asegurada la separación cuantitativa de Fe, Mn, Mo y Zn. Con los complejos así formados se realiza el análisis espectrográfico propiamente dicho, eligiéndose el método del patrón interno, y seleccionando como tal el tántalo en forma de óxido, (Ta_2O_5). La selección de las condiciones operatorias se realizó después de una amplia serie de pruebas, y son las que se relacionan en el siguiente apartado, [1-10].

2 — APARATOS Y CONDICIONES OPERATORIAS

Se trabaja con un espectrógrafo de la casa HILGER, modelo E-478, de gran dispersión, con montaje LITTROW. El sistema dispersor empleado es un prisma de cuarzo, con el cual se obtienen regis-

tros en la zona 2700-4500 Å. La rendija es de 1 mm de longitud y 15 µm de anchura.

Los electrodos utilizados son de cobre electrolítico (espectroscópicamente puro). El electrodo inferior, que actúa como ánodo, es cilíndrico, de 2 mm de diámetro exterior y perforado con un taladro de 1,5 mm hasta una profundidad de 4 mm; en el orificio así obtenido se introduce la muestra. Como contraelectrodo (cátodo) se utiliza una barra cilíndrica de 5 mm de diámetro, acabada en una punta cónica que es la que está en contacto con el arco. La separación entre los electrodos es de 5 mm, y el tiempo de exposición de 60 seg., tiempo que se comprobó era suficiente para conseguir la volatilización total de la muestra.

Como fuente de excitación se utiliza el arco de corriente continua, pues aunque proporciona menos precisión que la chispa en las determinaciones espectroquímicas, ofrece, sin embargo, mayor sensibilidad. El generador de corriente continua, proporciona una diferencia de potencial entre los electrodos de 35-40 V (230 V en la red), y una intensidad de 6 Amp.

Como material fotográfico más adecuado para registrar los espectrogramas se selecciona la película KODAK SPECTRUM ANALYSIS No. 1.

Para calcular la intensidad de las líneas espectrales se utiliza un microfotómetro, de la casa HILGER, modelo H-671, no registrador. En él se leen las desviaciones galvanométricas (D) que produce el ennegrecimiento de las líneas espectrales, y aplicando la corrección de Seidel: $(50-D)/D$, y mediante la curva de calibrado de la emulsión se obtiene el valor de la intensidad de la línea espectral.

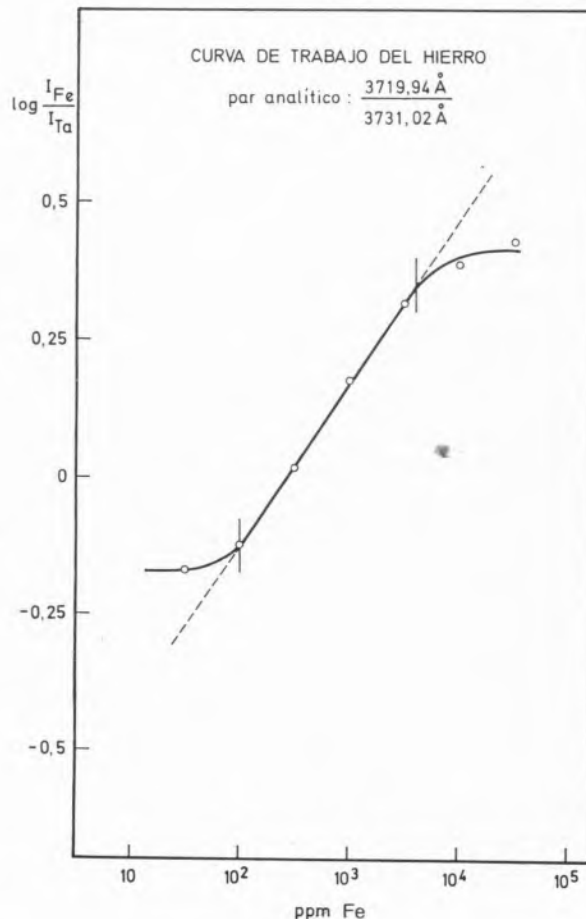
PATRONES ESPECTRALES

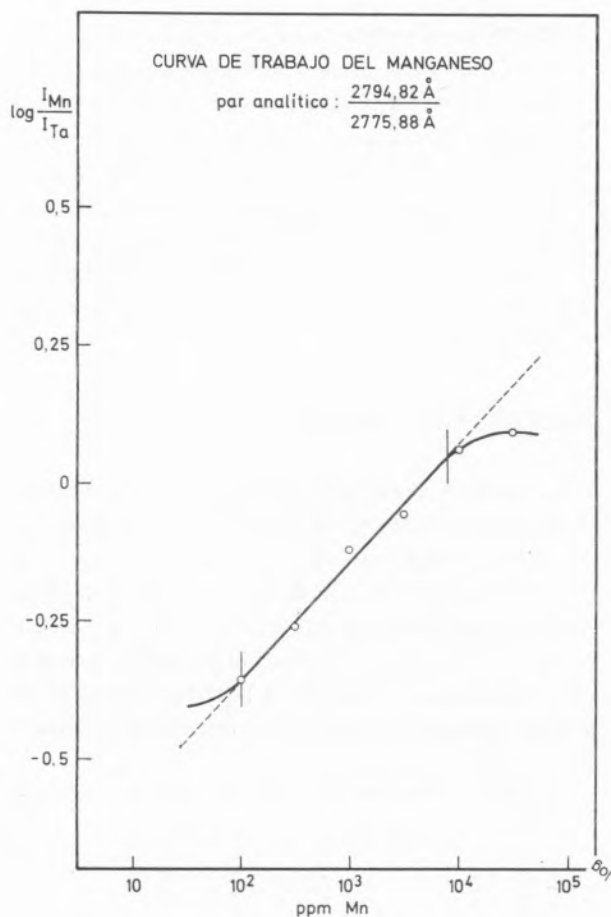
Se prepara una serie de 8 patrones espectrales, siendo la concentración de cada uno de los cuatro elementos a analizar de: 10; 31,6; 100; 316; 1000; 3160; 10 000 y 31 600 p.p.m. En la preparación de dichos patrones se procuró que su composición global fuera lo más parecida posible a la de la muestra preparada para su análisis, evitando así el "efecto matriz". Como base diluyente se utilizó, en todos los casos, CuO, con lo cual conseguimos no introducir nuevas líneas en los espectrogramas, ya que trabajamos con electrodos del mismo material. Los 8 patrones espectrales se obtuvieron por sucesivas diluciones con CuO, de un primer patrón espectral. En todos ellos

se introdujo el patrón interno (Ta_2O_5), en proporción 1:1. Con los datos resultantes del microfotometrado de los espectrogramas obtenidos en la excitación, por triplicado, de los patrones espectrales, se obtuvieron las cuatro curvas de trabajo (figs. 1, 2, 3 y 4), utilizando como pares analíticos, después de una rigurosa selección previa, los siguientes (en Å): Fe 3719,94/ Ta 3731,02; Mn 2794,82/ Ta 2775,88; Mo 3864,11/ Ta 3918,51 y Zn 3345,02/ Ta 3358,53.

METODO OPERATORIO

Las muestras, espigas de trigo, nos fueron suministradas por el Instituto de Edafología y Biología Vegetal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Una vez desgranada la espiga, los granos de trigo se introducen en una estufa a 65-75°C, durante un día entero, para eliminar la humedad. Los granos, entonces, se trituran y homogeneizan en un molino apropiado, y el polvillo resultante se conser-

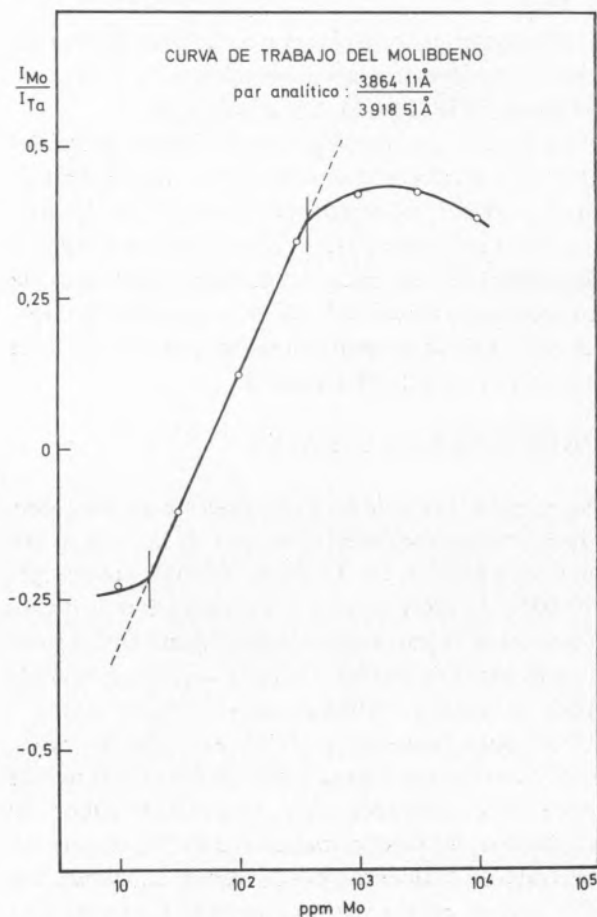


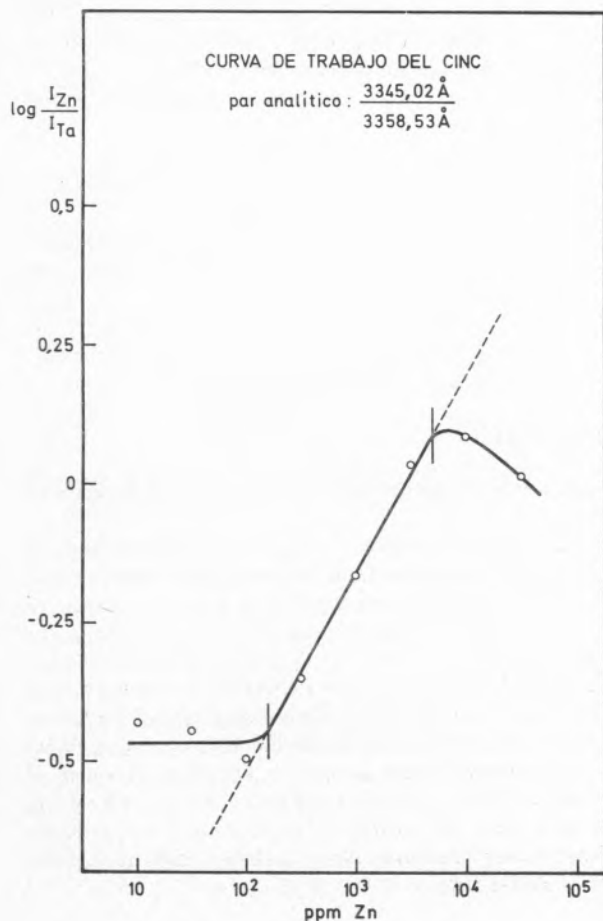


va en recipientes cerrados y secos. A continuación se pesa 1,0000 g de cada muestra y se introduce en un matraz de ataque de unos 50 cc. Se añaden 10 ml de HNO_3 conc. y se deja que el ataque transcurra durante dos días, con el fin de que la materia orgánica se oxide lentamente, y evitar así posibles pérdidas. El matraz se coloca en un baño de arena a una temperatura próxima a los 100°C , hasta conseguir un líquido transparente, lo cual indica ausencia de sílice. Se deja enfriar el matraz, y se añaden 2 ml de HClO_4 conc. Se prosigue el ataque aumentando la temperatura del baño a $120\text{--}140^\circ\text{C}$, procurando no llegar a sequedad. El matraz se retira cuando la solución queda totalmente incolora. Se añade entonces agua destilada hirviendo, para que se disuelvan las sales solubles, y se filtra en caliente. El filtrado, se enrasa a 50 ml con agua destilada.

Las muestras así atacadas presentan un pH extremadamente ácido (del orden de 0,5-1), y por tanto, para ajustar el pH a $5,0 \pm 0,3$ se ha de añadir, primero NH_4OH hasta conseguir un pH próximo a 5, y a continuación la suficiente cantidad de tampón

AcH/AcNH_4 para fijar el pH en el intervalo deseado. Con los 50 ml de cada muestra se realizan tres extracciones con 10 ml de reactivo PDTCH al 2%, en cloroformo. La agitación se realiza mecánicamente durante 10 min. Las fases clorofórmicas se transvasan a crisoles de porcelana, y se deja que el cloroformo se evapore a sequedad. Los residuos se someten a un proceso de mineralización por vía seca. Para ello se introducen los crisoles, primero, en una estufa a 120°C para eliminar la humedad, y después, en un horno mufla. Se va elevando lentamente la temperatura hasta alcanzar los 450°C , y se mantiene esta temperatura durante cuatro horas. El crisol enfriado se introduce en un desecador; los residuos de la calcinación se pesan y se mezclan, en igual proporción, con el patrón interno (Ta_2O_5), homogeneizando dicha mezcla en un micromolino de bolas, de ágata. Esta mezcla se introduce en los electrodos, y se excita en el arco de corriente continua. Los espectrogramas obtenidos se microfotometran por triplicado, y el valor de las concentraciones se deduce a partir de las curvas de trabajo. Para referir





los resultados al grano de trigo, es preciso tener en cuenta el factor de concentración del proceso, que en nuestro caso es de $55 \times$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una cuidadosa interpretación del hábito que presentan las curvas de trabajo nos permite deducir el rango de sensibilidad (tramo recto de la curva) de la técnica espectroquímica, resultando ser, en nuestras condiciones de trabajo, como sigue: Fe (100-4000 ppm), Mn (100-8000 ppm), Mo (15-300 ppm) y Zn (150-5000 ppm). Teniendo en cuenta el factor de concentración ($55 \times$), logrado a lo largo de todo el proceso de preparación de la muestra, podemos conocer el rango de sensibilidad en la determinación espectroquímica de grano de trigo: Fe (2-80 ppm); Mn (2-150 ppm); Mo (0,3-6 ppm) y Zn (3-100 ppm). Por otra parte, a partir de la pendiente de las curvas de trabajo se puede calcular la sensibilidad media del método, resultando ser de 1 p.p.m. La precisión la obtenemos a partir de la desviación standard de los resultados obtenidos con los patrones espectrales. La precisión varía de un elemento a otro, pero como valor medio oscila en el intervalo 10-15%. Los resultados obtenidos en el análisis de las 19 muestras de trigo, así como las características de dichas muestras, se presentan en la Tabla I.

Tabla 1
Características de las muestras, y concentración de los micronutrientes

MUESTRA	TIPO DE SUELO	VARIEDAD DE TRIGO	ABONADO EN FOSFORO	PESO (g) DE LA ESPIGA	ppm Fe EN EL GRANO	ppm Mn EN EL GRANO	ppm Mo EN EL GRANO	ppm Zn EN EL GRANO
1	Malpica	Siete Cerros	F-1	1,85	50,7	68,6	—	40,1
2	Malpica	Siete Cerros	F-2	1,97	60,6	70,5	0,9	50,0
3	Malpica	Siete Cerros	F-4	2,02	52,8	68,3	1,0	42,5
4	Malpica	Siete Cerros	F-5	1,79	64,8	69,6	2,0	71,3
5	Malpica	Yécora	F-1	1,20	50,4	59,7	0,8	72,4
6	Malpica	Yécora	F-2	1,45	56,4	69,9	0,8	70,0
7	Malpica	Yécora	F-4	1,50	47,1	69,6	0,9	50,4
8	Malpica	Yécora	F-5	1,30	53,1	91,5	1,5	66,4
9	Malpica	Pané	F-1	1,80	38,6	59,5	1,0	41,4
10	Malpica	Pané	F-4	1,67	49,6	88,4	1,5	48,3
11	Malpica	Pané	F-5	1,63	55,8	101,5	2,4	66,5
12	Finca	Siete Cerros	F-1	0,67	49,6	59,3	0,7	73,3
13	Finca	Siete Cerros	F-4	0,83	43,0	58,5	0,8	68,7
14	Finca	Siete Cerros	F-5	0,67	35,7	59,9	0,9	63,0
15	Finca	Yécora	F-1	1,00	36,0	70,2	0,6	62,4
16	Finca	Yécora	F-2	0,58	47,8	85,6	0,6	64,7
17	Finca	Pané	F-1	0,64	42,4	68,4	0,8	94,0
18	Finca	Pané	F-4	0,39	59,2	80,2	0,9	94,7
19	Finca	Pané	F-5	0,71	43,7	106,3	1,0	83,0

Un análisis minucioso de los resultados, nos permite establecer ciertas correlaciones entre los parámetros característicos de las muestras. Se observa que las espigas son de mayor peso si se trata de trigo Siete Cerros, cultivado en suelo Malpica y con un grado de abonado en fósforo intermedio. En general, un mayor abonado en fósforo hacen que las muestras presenten mayores contenidos de micronutrientes, lo cual también se favorece, por término medio, si el suelo es de tipo Malpica, y el trigo es Pané. Por último, el factor de concentración logrado mediante la complejación con PDTCH, y posterior extracción en cloroformo, hacen del método propuesto un valioso medio para conocer, rápida y simultáneamente, los niveles de concentraciones de dichos elementos en plantas, lo cual nos capacita para diagnosticar su estado nutricional.

Recibido 16.Março.1982

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. E. BOWEN, *Plant Physiol.*, **44**, 255-261 (1969).
- [2] F. BURRIEL MARTI & S. JIMENEZ GOMEZ, *Anales Edafol. Fisiol. Vegetal* (Madrid), **12**, n.º 1 (1953).
- [3] E. LAKANEN, *Atomic Absorption Newsletter*, **5**, No. 2, 17-18 (1966).
- [4] R. L. MITCHELL, R. O. SCOOT, *J. Soc. Chem. Ind.*, **66**, 330-336 (1947).
- [5] J. J. MORTVEDT, P. M. GIORDANO, W. L. LINDSAY, "Micronutrients in Agriculture", Soil Science Society of America Inc., Madison (Wisconsin) (1972).
- [6] C. MULFORD, *Atomic Absorption Newsletter*, **5**, No. 4, 88-90 (1966).
- [7] B. RAZMILIC, T. FIGUEROA, *Idesia*, **4**, 47-68 (1976).
- [8] M. SILLANPAA, "Los oligoelementos en los Suelos y en la Agricultura", F. A. O., Roma (1972).
- [9] J. D. WINEFORDNER, "Trace Analysis; Spectroscopic Methods for Elements", Chemical Analysis Series, vol. 46, New York (1976).
- [10] A. N. ZAIDEL', V. K. PROKOF'EV, S. M. RAISKII, V. A. SLAVNYI, E. YA. SCHREIDER, "Tables of Spectral Lines", I. F. I./Plenum Press, New York (1969).

ABSTRACT

Spectrochemical determination of micronutrients in grain of wheat.

We have studied a method for spectroscopic determination of micronutrients (Fe, Mn, Mo and Zn), in grains of wheat, using as analytical technique, atomic emission spectroscopy. Samples are previously attacked with concentrated HNO_3 and HClO_4 . For making better the sensitivity of the method, micronutrients are extracted to $\text{pH} = 5,0 \pm 0,3$, with 1-pirrolidindithiocarboxylic acid (PDTCH), 2% in chloroform. Complexes developed are burned at 450°C , and are analyzed spectrochemically employing Ta_2O_5 as internal standard, in proportion 1:1. The average sensitivity of method is 1 ppm, and its accuracy about 10-15%. This method allows to know with rapidity and simultaneously, concentration levels of these elements in plants, making possible to diagnose their nutritive state.