

**CNA COMISIÓN DE NORMALIZACIÓN Y ACREDITACIÓN
SOCIEDAD CHILENA DE LA CIENCIA DEL SUELO**

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE TEJIDOS VEGETALES

Angélica Sadzawka R., Renato Grez Z.,
María Adriana Carrasco R. y María de la Luz Mora G.

Revisión
2004

TABLA DE CONTENIDO

- Introducción
- Método 1 Preparación de la muestra
 - 1.1 Secado y molienda
- Método 2 Calcinación
 - 2.1 En mufla a 500°C
 - 2.2 En presencia de nitrato de magnesio
- Método 3 Digestión
 - 3.1 En tubo con H₂SO₄-ácido salicílico-catalizador.
- Método 4 Extracción
 - 4.1 Con agua
 - 4.2 Con ácido acético 2%
- Método 5 Nitrógeno
 - 5.1 Digestión y determinación por destilación y titulación manual
 - 5.2 Digestión y determinación colorimétrica
- Método 6 Fósforo
 - 6.1 Calcinación y determinación por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato
- Método 7 Calcio, magnesio, potasio y sodio
 - 7.1 Calcinación y determinación por espectrofotometría de absorción y emisión atómica
- Método 8 Cinc, cobre, hierro y manganeso
 - 8.1 Calcinación y determinación por espectrofotometría de absorción atómica
- Método 9 Boro
 - 9.1 Calcinación y determinación colorimétrica con azometina-H
- Método 10 Aluminio
 - 10.1 Calcinación y determinación por espectrofotometría de absorción atómica
- Método 11 Azufre
 - 11.1 Calcinación y determinación por turbidimetría
- Método 12 Hierro

12.1 Extracción con 1,10-fenantrolina y determinación por espectrofotometría de absorción atómica

- Método 13 Cloruro
 - 13.1 Extracción con HNO_3 0,3 mol/L y determinación por titulación potenciométrica
- Método 14 Nitrato
 - 14.1 Extracción con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y determinación con electrodo selectivo de ión nitrato

INTRODUCCIÓN

La Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo creó en 1997 la Comisión de Normalización y Acreditación (CNA) con la misión de realizar un Programa de Normalización de Técnicas y de Acreditación de Laboratorios para los análisis de suelos y de tejidos vegetales.

Esta Comisión está actualmente integrada por las siguientes personas:

Presidente	Dr. Renato Grez Z. Químico, Dr. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Forestales
Directora Ejecutiva	Angélica Sadzawka R. - Química Farmacéutica Instituto de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional de Investigación La Platina
Directores	María Adriana Carrasco R. - Química MSc. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas
	Hugo Flores P. Estadístico Instituto de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional de Investigación La Platina
	Dra. María de la Luz Mora G. – Química, Dra. Universidad de la Frontera Instituto de Agroindustria
	Carlos Rojas W. - Ingeniero Agrónomo, PhD. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional de Investigación La Platina

En esta publicación se entregan los métodos que la CNA recomienda para el análisis de tejidos vegetales, las cuales, evidentemente, están en constante revisión con el fin de actualizarlos y complementarlos.

MÉTODO 1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1.1 Secado y molienda

1 Principio

- 1.1 La preparación de la muestra de tejidos vegetales es crítica para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, deben seguirse procedimientos adecuados para su descontaminación, secado, molienda y almacenaje.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Esponja o cepillo con cerdas de nylon
- 2.2 Estufa con aire forzado capaz de mantener una temperatura de 70-80°C
- 2.3 Molino equipado con tamices de tamaño de poro de 1,0 mm y de 0,5 mm
- 2.4 Refrigerador (no indispensable)

3 Reactivos

- 3.1 Solución de detergente
Preparar una solución 0,1 a 0,3% a partir de un detergente no iónico (sin fosfato).

4 Procedimiento

Descontaminación

- 4.1 Examinar las muestras frescas de tejidos vegetales y, si no se observan partículas extrañas, no es necesaria la descontaminación, excepto si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si.
- 4.2 Si se observan partículas de polvo, basta eliminarlas con un cepillo (2.1) para descontaminar la muestra, siempre que no sea de interés determinar los contenidos de Al, Fe, Mn o Si.
- 4.3 Si se requiere el análisis de Al, Fe, Mn o Si, las muestras deben lavarse con la solución de detergente (3.1) y enjuagarse con agua destilada o desionizada.

Nota 1

Este proceso no debe durar más de 15 segundos para evitar pérdidas de nitrato, boro, potasio y cloruro.

- 4.4 Después de la descontaminación, las muestras deben secarse inmediatamente para estabilizar el tejido y detener las reacciones enzimáticas.

Secado

- 4.5 Introducir las muestras en bolsas de papel.

- 4.6 Colocar las bolsas en una estufa con aire forzado (2.2) y secar a 70-80°C por 12 a 24 horas.

Nota 2

Los tejidos con altos contenidos de carbohidratos pueden requerir otro tipo de procedimiento de secado.

Molienda

- 4.7 Una vez seca, moler la muestra en un molino (2.3) hasta que pase a través de un tamiz de 1,0 mm si para el análisis se requiere una alícuota > 0,5 g o de un tamiz de 0,5 mm si se requiere una alícuota < 0,5 g.
- 4.8 Después de la molienda, homogenizar la muestra y separar una porción de 5 a 10 g para los análisis y almacenaje.

Almacenaje

- 4.9 Colocar la porción de muestra representativa, molida y homogénea, en un recipiente hermético de plástico.
- 4.10 Almacenar en un lugar oscuro, frío y seco.

Nota 3

Si los análisis no se realizan inmediatamente, almacenar en refrigerador (4°C).

Las muestras molidas pueden almacenarse a temperatura ambiente, pero deben secarse a 65-70°C por 2 horas y luego enfriarse en desecador, antes de pesar para los análisis.

5 Referencias

- 5.1 JONES, J.B. Jr. and V.W. CASE. 1990. Sampling, handling, and analyzing tissue samples. *In*: Westerman, R.L. (Ed.). Soil testing and plant analysis. Third edition. Number 3 in the Soil Science Society of America Book Series. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, 389-427.
- 5.2 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

MÉTODO 2 CALCINACIÓN

2.1 En mufla a 500°C

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se calcina a 500°C. Las cenizas se disuelven en HCl diluido y en la solución resultante se pueden determinar las concentraciones de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P y Zn.

Nota 1

Este método no es adecuado para As, Hg, S y Se.

Los tejidos vegetales con altos contenidos de azúcares o aceites pueden requerir la adición de soluciones para facilitar la calcinación (H_2SO_4 10%, HNO_3 69% o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7%).

Este método no es recomendado para tejidos vegetales altos en Si debido a la pobre recuperación de los micronutrientes, especialmente Zn y Fe.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Crisoles o cápsulas de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad con tapa o vidrio de reloj.
- 2.2 Mufla.
- 2.3 Plancha calefactora.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.

Nota 2

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido clorhídrico, HCl.

3.2.1. HCl 37% d=1,19 kg/L

3.2.2. HCl 32% d=1,16 kg/L

- 3.3 Ácido clorhídrico 2 mol/L.

Diluir 166 mL de HCl 37% (3.2.1) (o 197 mL de HCl 32% (3.2.2)) con agua y llevar a 1 L.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 1 a 3 g (exactitud 0,01g) de muestra de tejido vegetal seca y molida a 1 mm en un crisol (2.1). Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
- 4.2 Colocar los crisoles en una mufla y lentamente subir la temperatura de manera de alcanzar los 500°C en dos horas. Calcinar por 4-8 horas a 500°C.

Nota 3

La temperatura no debe exceder de 500°C para evitar pérdidas potenciales de Al, B, Cu, Fe, K y Mn.

- 4.3 Dejar enfriar la mufla a temperatura ambiente, lentamente abrir la puerta, sacar los crisoles evitando disturbar las cenizas y tapparlos.
- 4.4 Entreabriendo la tapa, agregar cuidadosamente 1-2 mL de agua para humedecer las cenizas.
- 4.5 Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 2 mol/L (3.3) y hervir en una plancha calefactora. Enfriar.
- 4.6 Filtrar el contenido del crisol a través de papel filtro de tamaño de poro $\leq 3 \mu\text{m}$, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 mL o 100 mL. Lavar y enrasar con agua.
- 4.7 En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de P (Método 6.1), Ca, Mg, K y Na (Método 7.1), Cu, Fe, Mn y Zn (Método 8.1), B (Método 9.1) y Al (Método 10.1).

5 Referencias

- 5.1 COTTENIE, A. 1984. Los análisis de suelos y de plantas como base para formular recomendaciones sobre fertilizantes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Boletín de Suelos de la FAO 38/2, Roma, Italia, 116p.
- 5.2 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

MÉTODO 2 CALCINACIÓN

2.2 En presencia de nitrato de magnesio

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se mezcla con nitrato de magnesio y se calcina a 500°C. Las cenizas se disuelven en HCl diluido y en la solución resultante se puede determinar la concentración de S-SO₄.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Crisoles o cápsulas de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad con tapa o vidrio de reloj.
- 2.2 Mufla.
- 2.3 Plancha calefactora.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.
Nota 1
Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).
- 3.2 Solución de nitrato de magnesio, Mg(NO₃)₂, 95%.
Disolver 950 g de Mg(NO₃)₂·6H₂O en agua y diluir a 1L.
- 3.3 Ácido clorhídrico, HCl.
 - 3.3.1 HCl 37% d=1,19 kg/L
 - 3.3.2 HCl 32% d=1,16 kg/L
- 3.4 Ácido clorhídrico 2 mol/L.
Diluir 166 mL de HCl 37% (3.2.1) (o 197 mL de HCl 32% (3.2.2)) con agua y llevar a 1 L.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 0,25 g (exactitud 0,01 g) de muestra seca y molida a 0,5 mm de tejido vegetal en un crisol (2.1). Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
- 4.2 Agregar 2 mL de la solución de nitrato de magnesio (3.2).
- 4.3 Calentar en una plancha calefactora a 180°C durante 2 horas.
- 4.4 Colocar los crisoles aún calientes en la mufla y calcinar a 500°C durante 4 horas.
Nota 2
Si permanecen partículas negras, disgregar la muestra y volver a calcinar.
- 4.5 Dejar enfriar la mufla a temperatura ambiente, lentamente abrir la puerta, sacar los crisoles evitando disturbar las cenizas y taparlos.

- 4.6 Entreabriendo la tapa, agregar cuidadosamente 1 a 2 mL de agua para humedecer las cenizas.
- 4.7 Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 2 mol/L (3.4) y calentar a ebullición en una plancha calefactora. Enfriar.
- 4.8 Filtrar el contenido del crisol a través de papel filtro de tamaño de poro $\leq 3 \mu\text{m}$, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 mL. Lavar y enrasar con agua.
- 4.9 Determinar la concentración de S-SO₄ (Método 11.1).

5 Referencias

- 5.1 AOAC. 1995. Official methods of analysis of AOAC international. 16^a Ed. Volume I. Official method 923.01. AOAC International, Virginia, USA, Chapter 3, p 22.

MÉTODO 2 CALCINACIÓN

2.3 En presencia de óxido de plata y bicarbonato de sodio

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se mezcla con óxido de plata y bicarbonato de sodio y se calcina a 550°C. Las cenizas se disuelven en ácido acético diluido y en la solución resultante se puede determinar la concentración de S-SO₄.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Crisoles o cápsulas de porcelana o sílice de 30 mL de capacidad con tapa o vidrio de reloj.
2.2 Mufla.
2.3 Plancha calefactora.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.
Nota 1
Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).
3.2 Mezcla alcalina.
Mezclar 2 g de óxido de plata, Ag₂O, con 50 g de bicarbonato de sodio, NaHCO₃.
3.3 Ácido acético, C₂H₄O₂.
3.3.1 C₂H₄O₂ 100% d=1,05 kg/L
3.3.2 C₂H₄O₂ 96% d=1,06 kg/L
3.5 Solución de ácido acético 1 mol/L.
Diluir 57 mL de C₂H₄O₂ 100% (3.4.1) o 59 mL de C₂H₄O₂ 96% (3.4.2) a 1000 mL con agua.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 0,100 ± 0,005 g de muestra seca y molida a 0,5 mm de tejido vegetal en un crisol (2.1). Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
4.2 Agregar 0,52 g de mezcla alcalina (3.3) y mezclar. Golpear suavemente el crisol contra el mesón para emparejar la superficie de la mezcla.
4.3 Agregar 0,5 g de NaHCO₃ sobre la superficie de manera de cubrir completamente la muestra.
4.4 Colocar los crisoles en la mufla y calentar a 550°C durante 3 horas. Enfriar.
4.5 Agregar cuidadosamente 15 mL de la solución de ácido acético 1 mol/L (3.5).

- 4.6 Calentar en una plancha calefactora a 200°C durante 20 min. Enfriar.
- 4.7 Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y enrasar con agua.
- 4.8 Determinar la concentración de S-SO₄ por el Método 11.2 de Tejidos vegetales.

5 Referencias

- 5.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

MÉTODO 3 DIGESTIÓN

3.1 En tubo con H₂SO₄-ácido salicílico-catalizador.

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se digiere en tubo con H₂SO₄-ácido salicílico-catalizador. Este método está diseñado especialmente para la determinación de N pero también pueden determinarse Ca, Mg, Mn, Na, P y Zn.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Digestor de tubos capaz de alcanzar una temperatura de 380°C.
2.2 Tubos de digestión de 50-100 mL de capacidad.
2.3 Agitador vortex.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Acido sulfúrico, H₂SO₄ 98 %, densidad 1,84 kg/L.
3.3 Mezcla catalítica.
3.3.1 Disponible en el comercio
3.3.2 Mezclar moliendo en un mortero 100 g de sulfato de potasio, K₂SO₄, 10 g de sulfato de cobre, CuSO₄, 10 g de ácido salicílico, C₇H₆O₃, y 1 g de selenio, Se, en polvo.
3.4 Agua oxigenada, 25-30% de H₂O₂ (no esencial)

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 0,1 a 0,5 g (exactitud 0,001g) de muestra seca y molida a 0,5 mm de tejido vegetal en un tubo de digestión (2.2). Incluir dos blancos y una muestra de referencia.

Nota 2

Es conveniente secar nuevamente la muestra a 70°C antes de pesar porque, si contiene más de un 5% de agua, puede perderse nitrato debido al calentamiento que se produce con la adición posterior de ácido sulfúrico.

- 4.2 Agregar 2 g de mezcla catalítica (3.3).
4.3 Agregar 5,0 mL de H₂SO₄ (3.2).
4.4 Mezclar sobre un agitador vortex (2.3) durante 15 segundos.

Nota 3

Es esencial que la muestra se humedezca completamente.

4.5 Dejar reposar al menos 2 h.

Nota 4

El reposo es necesario para que se formen los compuestos nitro-salicílicos.

4.6 Colocar los tubos en el digestor y calentar a 100°C por al menos 2 h.

Nota 5

Este tratamiento es necesario para la reducción completa de los compuestos nitro-salicílicos.

4.7 Subir la temperatura del digestor a 380°C y mantenerla por 2 horas.

Nota 6

Si se forma una cantidad excesiva de espuma, sacar los tubos del digestor, enfriar por 2 min y agregar lentamente porciones de 1 mL de H₂O₂ (3.4) hasta la desaparición de la espuma y continuar con la digestión a 380°C. Al final puede persistir un color verde azulado.

4.8 Sacar los tubos del digestor y dejar enfriar bajo campana por 5-10 min.

4.9 Agregar 10-20 mL de agua para prevenir la formación de cristales.

4.10 Filtrar a través de un papel filtro de tamaño de poro < 11 µm y recibir en un matraz aforado de 50 mL, lavar y enrasar con agua.

Nota 7.

Si se determinará solamente N por destilación (Método 5.1), se puede omitir este punto.

4.11 En el filtrado se puede determinar la concentración de N por destilación y titulación manual (Método 5.1) o por colorimetría (Método 5.2).

5 Referencias

- 5.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.
- 5.2 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 3 DIGESTIÓN

3.2 En matraz con H₂SO₄-ácido salicílico-H₂O₂.

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se digiere en un matraz con H₂SO₄-ácido salicílico-H₂O₂. Este método está diseñado especialmente para la determinación de N pero también pueden determinarse Ca, K, Mg, Mn, Na, P y Zn.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Plancha calefactora capaz de alcanzar una temperatura de 300°C.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Mezcla para digerir.

A un matraz erlenmeyer de 250 mL, colocado en un baño de agua fría, agregar:

→ 18 mL de agua,

→ 100 mL de ácido sulfúrico 96%, d=1,84 kg/L, en pequeñas porciones y agitando,

→ 6 g de ácido salicílico, C₇H₆O₃. Disolver con la ayuda de un agitador magnético.

- 3.3 Agua oxigenada, 25-30% de H₂O₂.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 0,1 a 0,5 g (exactitud 0,001g) de muestra seca y molida a 0,5 mm de tejido vegetal en un papel de aluminio y transferir a un matraz aforado de 50 mL o matraz erlenmeyer de 100-125 mL. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.

- 4.2 Agregar 5 mL de la mezcla para digerir (3.2) y agitar cuidadosamente hasta que toda la muestra se humedezca.

- 4.3 Dejar reposar durante la noche.

Nota 2

El reposo es necesario para que se formen los compuestos nitro-salicílicos.

- 4.4 Calentar en la plancha calefactora (2.1) a 180°C durante 1 hora.

Nota 3

Este tratamiento es necesario para la reducción completa de los compuestos nitro-salicílicos.

- 4.5 Sacar los matraces de la plancha y dejar enfriar.

- 4.6 Agregar 5 gotas de agua oxigenada (3.3).
- 4.7 Colocar en la plancha y subir la temperatura a 280°C y calentar por 5-10 min hasta la aparición de humos blancos.
- 4.8 Repetir los puntos 4.5 a 4.7 hasta que el digerido se torne incoloro.
- 4.9 Sacar los matraces de la plancha y dejar enfriar.
- 4.10 Agregar alrededor de 10-20 mL de agua y agitar hasta disolución del precipitado.
- 4.11 Filtrar a través de un papel filtro de tamaño de poro < 11 µm y recibir en un matraz aforado de 50 mL, lavar y enrasar con agua.

Nota 4

Si se determinará solamente N por destilación (Método 5.1), se puede omitir este punto.

- 4.11 En el filtrado se puede determinar la concentración de N por destilación y titulación manual (Método 5.1) o por colorimetría (Método 5.2).

5 Referencias

- 5.1 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 4 EXTRACCIÓN

4.1 Con agua

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se extrae con agua y en el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cl, N-NO₃, N-NO₂ y S-SO₄.

Nota 1

Este es un método de extracción semicuantitativo porque extrae solamente los aniones que están "libres" en el tejido vegetal

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Agitador recíproco.
2.2 Papel filtro de tamaño de poro < 3 µm.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 1 g (exactitud 0,001g) de muestra seca y molida a 1 mm de tejido vegetal en un papel de aluminio y transferir a un matraz erlenmeyer de 100 mL. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
4.2 Agregar 50 mL de agua (3.1).
4.3 Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4.4 Filtrar por papel filtro plegado (2.2).
4.5 Si el filtrado sale turbio, volver a pasarlo por el mismo papel filtro.
4.6 En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cl (Método 13.1), N-NO₃ (Método 14.1), N-NO₂ y S-SO₄.

5 Referencias

- 5.1 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 4 EXTRACCIÓN

4.2 Con ácido acético 2%

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal seca y molida se extrae con ácido acético 2% y en el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cl, N-NH₄, N-NO₃, P-PO₄ y S-SO₄.

Nota 1

Este es un método de extracción semicuantitativo porque extrae solamente los aniones que están "libres" en el tejido vegetal

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Agitador recíproco.
2.2 Papel filtro de tamaño de poro < 3 µm.

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.
3.2 Ácido acético 2%
Diluir 20 mL de CH₃COOH 100% con agua (3.1) a 1 L.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar 0,2 a 0,5 g (exactitud 0,001g) de muestra seca y molida a 0,5 mm de tejido vegetal en un papel de aluminio y transferir a un matraz erlenmeyer de 100 mL. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
4.2 Agregar 50 mL de ácido acético 2% (3.2).
4.3 Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4.4 Filtrar por papel filtro plegado (2.2).
4.5 Si el filtrado sale turbio, volver a pasarlo por el mismo papel filtro.
4.6 En el filtrado se pueden determinar las concentraciones de Cl (Método 13.1), N-NH₄, N-NO₃, P-PO₄ y S-SO₄.

5 Referencias

- 5.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

MÉTODO 5 NITRÓGENO

5.1 Digestión y determinación por destilación y titulación manual

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la digestión según el Método 3.1 o el Método 3.2, se determina la concentración de N-NH₄ por destilación de NH₃ y titulación manual.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Destilador por arrastre de vapor.
- 2.2 Titulador automático (no indispensable).

3 Reactivos

- 3.1 Solución de hidróxido de sodio, NaOH, 400 g/L.
Disolver 2 kg de NaOH en pellets en aprox. 3 L de agua. Enfriar la solución con el frasco tapado para evitar la absorción de CO₂. Diluir a 5 L con agua recién hervida y enfriada. Mezclar bien y guardar protegido del CO₂ ambiental.
- 3.2 Indicador mezclado.
Disolver 0,165 g de rojo de metilo y 0,30 g de verde de bromocresol en 500 mL de etanol 96 %.
- 3.3 Solución de ácido bórico-indicador.
Disolver 20 g de ácido bórico, H₃BO₃, en aprox. 900 mL de agua caliente, enfriar y agregar 20 mL de indicador (3.2). Diluir a 1 L con agua y mezclar bien.
- 3.4 Solución estándar de nitrógeno, 0,01 mol/L de N-NH₄.
Disolver 0,6607 g de sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄, seco a 105°C, en alrededor de 400 mL de agua. Agregar 45 mL de H₂SO₄ 96%, d=1,84 kg/L, enfriar y diluir con agua a 1000 mL.
- 3.5 Acido clorhídrico estándar 0,010 mol/L.
Disponible en el comercio.

4 Procedimiento

- 4.1 Encender el destilador por arrastre de vapor hasta ebullición.
- 4.2 Transferir con una pipeta 10 mL de solución de ácido bórico-indicador (3.3) a un matraz erlenmeyer de 100-125 mL y colocarlo bajo el extremo del condensador.
- 4.3 Transferir cuantitativamente el contenido del tubo de digestión proveniente del punto 4.9 del Método 3.1 o del matraz proveniente del punto 4.10 del Método 3.2 (o una alícuota que contenga 0,1 a 3,0 mg de N-NH₄ del filtrado del punto 4.10 o

4.11, respectivamente) al matraz del destilador, diluir a aprox. 50 mL con agua y conectar al sistema.

- 4.4 Agregar 30 mL de solución de NaOH 400 g/L (3.1) al matraz de destilación, lavar con una pequeña cantidad de agua y cerrar la llave.
- 4.5 Destilar aproximadamente 75 mL o durante el tiempo óptimo para el sistema en uso.
- 4.6 Sacar el matraz del destilador, lavar el extremo del condensador y titular el destilado con HCl 0,01 mol/L (3.5) hasta que el color cambie de verde a rosado.

Nota 1

Puede usarse un titulador automático (2.2) fijando el punto final a pH 4,6 y omitiendo la adición de indicador mezclado.

- 4.7 Verificar el procedimiento destilando alícuotas de la solución estándar de N-NH₄ (3.4).

5 Cálculos

- 5.1 Calcular la concentración de N en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$N(\%) = \frac{(a - b) \times M \times V \times 1,4}{m \times A}$$

$$N(\text{g/kg}) = \frac{(a - b) \times M \times V \times 14}{m \times A}$$

donde:

- a = volumen en mL de HCl gastado en la muestra
- b = volumen promedio en mL de HCl gastado en los blancos
- M = concentración en mol/L del HCl
- V = volumen final en mL del filtrado. (Método 3.1, punto 4.10 o Método 3.2, punto 4.11) (si corresponde)
- m = masa en g de la muestra (Método 3.1, punto 4.1 o Método 3.2, punto 4.1)
- A = alícuota en mL del filtrado (Método 3.1., punto 4.10 o Método 3.2, punto 4.11) (si corresponde)

6 Informes

- 6.1 Informar la concentración de N en % con dos decimales o en g/kg con un decimal.

7 Referencias

- 7.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.
- 7.2 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 5 NITRÓGENO

5.2 Digestión y determinación colorimétrica

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la digestión según el Método 3.1 o Método 3.2, se determina la concentración de N-NH₄ por colorimetría.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro visible con celdas de una longitud de paso de luz de 10 mm.
2.2 Agitador vortex

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Solución de hidróxido de sodio, NaOH, 50%.
Disolver 100 g de NaOH en agua, enfriar y diluir 200 g.
- 3.3 Disodio hidrógeno fosfato
- 3.3.1 Na₂HPO₄
 - 3.3.2 Na₂HPO₄·2H₂O
 - 3.3.3 Na₂HPO₄·12H₂O
- 3.4 Solución tampón.
En un matraz aforado de 1000 mL agregar:
→ alrededor de 600 mL de agua,
→ 14,2 g de Na₂HPO₄ (3.3.1) o 17,8 g de Na₂HPO₄·2H₂O (3.3.2), o 35,8 g de Na₂HPO₄·12H₂O (3.3.3) y disolver,
→ 50 g de tartrato de potasio y sodio, C₄H₄KNaO₆·4H₂O, y disolver,
→ 108 g de solución de NaOH 50% (3.2) y mezclar,
→ agua hasta enrasar.
- 3.5 Solución de salicilato-nitroprusiato.
Disolver 150 g de salicilato de sodio, C₇H₅NaO₃, y 0,30 g de nitroprusiato de sodio, Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O, en agua y diluir a 1 L. Almacenar en frasco oscuro.
- 3.6 Solución de hipoclorito de sodio.
Diluir 6 mL de solución de hipoclorito de sodio, NaClO, 5,25% a 100 mL con agua. Preparar diariamente.
- 3.7 Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 98% d=1,84 kg/L.
- 3.8 Solución para diluir

- 3.8.1 Disolver 1,6 g de la mezcla catalítica usada en la digestión (Método 3.1, reactivo 3.3) en 4 mL de H₂SO₄ 98% (3.7) y diluir con agua con precaución a 2 L.
Nota 2
Esta solución se usa cuando la muestra digerida proviene del Método 3.1
- 3.8.2 Diluir 4 mL de la mezcla para digerir (Método 3.2, reactivo 3.2) con agua a 2 L.
Nota 3
Esta solución se usa cuando la muestra digerida proviene del Método 3.2.
- 3.9 Solución estándar de nitrógeno, 1000 mg/L de N-NH₄.
Disolver 4,715 g de sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄, seco a 105°C, en solución para diluir (3.8.1 o 3.8.2) en un matraz aforado de 1000 mL. Enrasar con la solución para diluir (3.8.1 o 3.8.2).
- 3.10 Solución estándar de nitrógeno, 100 mg/L de N-NH₄.
Diluir 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de N-NH₄ (3.9) a 100 mL con solución para diluir (3.8.1 o 3.8.2).
- 3.11 Serie de estándares de N-NH₄.
Diluir 0-1-2-3-4-5 mL de la solución estándar de 100 mg/L de N-NH₄ (3.10) a 100 mL con la solución para diluir (3.8.1 o 3.8.2).
Esta serie de estándares contiene 0-1-2-3-4-5 mg/L de N-NH₄.

4 Procedimiento

- 4.1 Diluir 50 veces el digerido que ya está diluido a 50 mL (Método 3.1, punto 4.10 o Método 3.2, punto 4.11) tomando 1 mL en un matraz aforado de 50 mL y enrasando con agua.
- 4.2 Transferir 1 mL de esta dilución y de la serie de estándares de N-NH₄ (3.11) a un tubo de ensayo.
- 4.3 Agregar 5,5 mL de la solución tampón (3.4) y mezclar sobre el agitador vortex (2.2).
- 4.4 Agregar 4 mL de solución de salicitalo-nitroprusiato (3.5) y mezclar.
- 4.5 Agregar 2 mL de solución de hipoclorito de sodio (3.6) y mezclar.
- 4.6 Dejar reposar durante 45 min. a 25°C o 15 min. A 37°C.
- 4.7 Leer la absorbancia a 650 nm antes de 2 horas.

Nota 4

Agitar cada tubo sobre el agitador vortex inmediatamente antes de leer.

5 Cálculos

- 5.1. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de N-NH₄ de la serie de estándares (3.11) y calcular la ecuación de regresión de mejor ajuste.

Nota 5

El coeficiente de regresión, R², debe ser > 0,99. De lo contrario, repetir las determinaciones

- 5.2. Calcular las concentraciones de N en los filtrados diluidos de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- 5.3. Calcular la concentración de N en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$N(\%) = \frac{(a - b) \times 0,25}{m}$$

$$N(\text{g/kg}) = \frac{(a - b) \times 2,5}{m}$$

donde:

- a = mg/L de N-NH₄ en el digerido diluido de la muestra
- b = mg/L promedio de N-NH₄ en los digeridos diluidos de los blancos
- m = masa en g de la muestra (Método 3.1, punto 4.1 o Método 3.2, punto 4.1)

6 Informes

- 6.1 Informar la concentración de N en % con dos decimales o en g/kg con un decimal.

7 Referencias

- 7.1 BAETHGEN, W.E. and ALLEY, M.M. 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 20(9&10):961-969.
- 7.2 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 6 FÓSFORO

6.1 Calcinación y determinación por colorimetría del fosfo-vanadomolibdato

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.1, se determina la concentración de P por colorimetría del complejo fosfo-vanadomolibdato.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro visible con celdas de una longitud de paso de luz de 10 mm.

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido clorhídrico, HCl.

3.2.1 HCl 37% d=1,19 kg/L

3.2.2 HCl 32% d=1,16 kg/L

- 3.3 Ácido clorhídrico 2 mol/L.

Diluir 166 mL de HCl 37% (3.2.1) (o 197 mL de HCl 32% (3.2.2)) con agua y llevar a 1 L.

- 3.4 Ácido nítrico.

3.4.1 HNO₃ 69% d=1,41 kg/L

3.4.2 HNO₃ 100% d=1,52 kg/L.

- 3.5 Solución de nitro-vanadomolibdato.

A Solución de vanadato de amonio, 0,9 g/L.

Disolver 0,9 g de NH₄VO₃ en alrededor de 500 mL de agua hirviendo, enfriar y agregar 24 mL de HNO₃ 69% (3.4.1) o 16 mL de HNO₃ 100% (3.4.2). Diluir con agua a 1 L.

B Solución de molibdato de amonio, 19 g/L.

Disolver 19 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O en agua a 50°C, enfriar y diluir a 1 L con agua.

C Ácido nítrico 1,5 mol/L

Diluir 97 mL de HNO₃ 69% (3.4.1) o 62 mL de HNO₃ 100% (3.4.2) con agua a 1 L.

Mezclar las soluciones A, B y C en partes iguales,

- 3.6 Solución estándar de fósforo, 1000 mg/L de P.

3.6.1 Disponible en el comercio.

- 3.6.2 Pesar $4,390 \pm 0,001$ g de fosfato dihidrógeno de potasio, KH_2PO_4 , secado a $105^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 h, en un matraz aforado de 1000 mL. Disolver y enrasar con agua.
- 3.7 Serie de soluciones estándares de fósforo.
A siete matraces aforados de 250 mL agregar:
→ 0-5-10-15-20-25-50 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de P (3.6),
→ 50 mL de HCl 2 mol/L (3.3),
→ agua hasta enrasar.
Esta serie de estándares contiene 0-20-40-60-80-100-200 mg/L de P

4 Procedimiento

- 4.1 Tomar una alícuota de 1 mL de los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.1, punto 4.6 y de la serie de estándares de P (3.7) en recipientes de vidrio.
- 4.2 Agregar 4 mL de la solución de nitro-vanadomolibdato (3.5) y mezclar.
- 4.3 Dejar reposar una hora.
- 4.4 Leer la absorbancia contra agua a 466 nm.

Nota 2

Puede usarse una longitud de onda entre 400 y 490 nm.

5 Cálculos

- 5.1. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de P de la serie de estándares (3.7) y calcular la ecuación de regresión de mejor ajuste.

Nota 3

El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las determinaciones

- 5.2. Calcular las concentraciones de P en los filtrados de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- 5.3. Calcular la concentración de P en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$P (\%) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 10.000}$$

$$P (\text{g/kg}) = \frac{(a - b) \times V}{m \times 1000}$$

donde:

- a = mg/L de P en el filtrado de la muestra
b = mg/L promedio de P en los filtrados de los blancos
V = volumen final en mL (Método 2.1 punto 4.6)
m = masa en g de muestra (Método 2.1, punto 4.1)

6. Informes

- 6.1. Informar la concentración de P, en la muestra de tejido vegetal, en % con dos decimales o en g/kg con un decimal

7 Referencias

- 7.1 COTTENIE, A. 1984. Los análisis de suelos y de plantas como base para formular recomendaciones sobre fertilizantes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Boletín de Suelos de la FAO 38/2, Roma, Italia, 116p.

MÉTODO 7 CALCIO, POTASIO, MAGNESIO Y SODIO

7.1 Calcínación y determinación por espectrofotometría de absorción y emisión atómica

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la calcínación según el Método 2.1, se determina la concentración de Ca, K, Mg y Na por espectrofotometría de absorción y emisión atómica con llama de aire-acetileno y agregando La para minimizar las interferencias.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) con lámparas de Ca y de Mg.

3 Reactivos

- 3.1 Agua con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido clorhídrico, HCl.

3.2.1 HCl 37% d=1,19 kg/L

3.2.2 HCl 32% d=1,16 kg/L

- 3.3 Solución estándar de calcio, 1000 mg/L de Ca.

Disponible en el comercio.

- 3.4 Solución estándar de potasio, 1000 mg/L de K

Disponible en el comercio.

- 3.5 Solución estándar de magnesio, 1000 mg/L de Mg

Disponible en el comercio.

- 3.6 Solución estándar de sodio, 1000 mg/L de Na.

Disponible en el comercio.

- 3.7 Solución de lantano, 10 g/L de La.

3.7.1 Disolver 31,2 g de nitrato de lantano hexahidrato, $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en agua en un matraz aforado de 1000 mL. Agregar 83 mL de HCl 37% (3.2.1) (o 98 mL de HCl 32% (3.2.2) y enrasar con agua.

3.7.2 Disolver 11,7 g de óxido de lantano, La_2O_3 , en alrededor de 200 mL de agua en un matraz aforado de 1000 mL. Colocar en un baño de agua fría y agregar lentamente y con agitación constante, 100 mL de HCl 37% (3.2.1) o 120 mL de HCl 32% (3.2.2). Enfriar y enrasar con agua.

- 3.8 Solución de lantano, 1,04 g/L de La.

Diluir 104 mL de la solución de lantano de 10 g/L (3.7.1 o 3.7.2) a 1000 mL con agua.

3.9 Serie de estándares mezclados de Ca, K, Mg y Na.

A seis matraces aforados de 1000 mL agregar:

- 0-5-10-15-20-25 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Ca (3.3),
- 0-5-10-15-20-25 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de K (3.4),
- 0-1-2-3-4-5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Mg (3.5),
- 0-1-2-3-4-5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Na (3.6),
- 100 mL de la solución de 10 g/L de La (3.7),
- agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares mezclados contiene 0-5-10-15-20-25 mg/L de Ca y K y 0-1-2-3-4-5 mg/L de Mg y Na.

Nota 2

Si por las características del EAA (2.1) es necesario utilizar otros rangos de concentración para que las lecturas se sitúen en el rango de linealidad, proceder a efectuar las diluciones que sean necesarias, siguiendo como referencia la técnica descrita.

4 Procedimiento

- 4.1 Transferir a un recipiente adecuado una alícuota de 1 mL del filtrado de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.1, punto 4.6.
- 4.2 Agregar 24 mL de la solución de 1,04 g/L de La (3.8). Mezclar.
- 4.3 En un EAA (2.1), con llama de aire-acetileno y calibrado con la serie de estándares mezclados de Ca, K, Mg y Na (3.9), leer las concentraciones de:
 - Ca por absorción a 422,7 nm,
 - Mg por absorción a 285,2 nm,
 - K por emisión a 766,5 nm,
 - Na por emisión a 589,0 nm.

5 Cálculos

- 5.1. Calcular las concentraciones de Ca, Mg, K y Na en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$\text{Ca, Mg, K o Na (\%)} = \frac{(a - b) \times V \times 0,0025}{m}$$

$$\text{Ca, Mg, K o Na (g/kg)} = \frac{(a - b) \times V \times 0,025}{m}$$

donde:

- a = mg/L de Ca, Mg, K o Na en el filtrado de la muestra
- b = mg/L promedio de Ca, Mg, K o Na en los filtrados de los blancos
- V = volumen final en mL (Método 2.1, punto 4.6)

m = masa en g de muestra (Método 2.1, punto 4.1)

6 Informes

- 6.1 Informar las concentraciones de Ca, Mg, K y Na en % con dos decimales o en g/kg con un decimal.

7 Referencias

- 7.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.
- 7.2 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 8 COBRE, HIERRO, MANGANESO Y CINCO

8.1 Calcinación y determinación por espectrofotometría de absorción atómica

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.1, se determina la concentración de Cu, Fe, Mn y Zn por espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire-acetileno.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro de absorción atómica con lámparas de Cu, Fe, Mn y Zn.

3 Reactivos

- 3.1 Ácido clorhídrico, HCl.
- 3.1.1 HCl 37% d=1,19 kg/L
- 3.1.2 HCl 32% d=1,16 kg/L
- 3.2 Solución estándar de cobre, 1000 mg/L de Cu.
Disponible en el comercio.
- 3.3 Solución estándar de hierro, 1000 mg/L de Fe.
Disponible en el comercio.
- 3.4 Solución estándar de manganeso, 1000 mg/L de Mn.
Disponible en el comercio.
- 3.5 Solución estándar de cinc, 1000 mg/L de Zn.
Disponible en el comercio.
- 3.6 Solución de estándares mezclados de Cu, Fe, Mn y Zn.
A un matraz aforado de 200 mL agregar:
- 5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Cu (3.2),
 - 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Fe (3.3),
 - 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Mn (3.4),
 - 5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Zn (3.5),
 - agua hasta enrasar.
- Esta solución contiene 25 mg/L de Cu y de Zn y 50 mg/L de Fe y Mn.
- 3.7 Serie de estándares mezclados de Cu, Fe, Mn y Zn.
A siete matraces aforados de 250 mL agregar:
- 0-1-2-5-10-20-30 mL de la solución de estándares mezclados de Cu, Fe, Mn y Zn (3.6),
 - 8 mL de HCl 37% (3.1.1) o 10 mL de HCl 32% (3.1.2),
 - agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene 0,0-0,1-0,2-0,5-1,0-2,0-3,0 mg/L de Cu y de Zn, y 0,0-0,2-0,4-1,0-2,0-4,0-6,0 mg/L de Fe y Mn.

Nota 1

Si por las características del EAA (2.1) es necesario utilizar otros rangos de concentración para que las lecturas se sitúen en el rango de linealidad, proceder a efectuar las diluciones que sean necesarias, siguiendo como referencia la técnica descrita.

4 Procedimiento

- 4.1 En los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.1, punto 4.6, y usando un espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire-acetileno y calibrado con la serie de estándares mezclados de Cu, Fe, Mn y Zn (3.7), leer las concentraciones de:
- Cu a 324,7 nm,
 - Fe a 248,3 nm,
 - Mn a 279,5 nm,
 - Zn a 213,8 nm.

5 Cálculos

- 5.1. Calcular las concentraciones de Cu, Fe, Mn y Zn en la muestra, en mg/kg, según:

$$\text{Cu, Fe, Mn o Zn (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

donde:

- a = mg/L de Cu, Fe, Mn o Zn el filtrado de la muestra
- b = mg/L promedio de Cu, Fe, Mn o Zn en los filtrados de los blancos
- V = volumen final en mL (Método 2.1, punto 4.6)
- m = masa en g de muestra (Método 2.1, punto 4.1)

6 Informes

- 6.1 Informar las concentraciones de Cu, Fe, Mn y Zn en la muestra, en mg/kg sin decimales

7 Referencias

- 7.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

- 7.2 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 9 BORO

9.1 Calcinación y determinación colorimétrica con azometina-H

1 Principio

- 1.1 En el filtrado, proveniente de la calcinación según el Método 2.1, se determina la concentración de boro por colorimetría con azometina-H.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro visible con celdas de una longitud de paso de luz de 10 mm.

3 Reactivos

Nota 1

Para prevenir la liberación de B del material de vidrio, llenarlo con HNO₃ 4 mol/L, dejar reposar durante la noche y lavar en la forma habitual.

Los reactivos y soluciones estándares deben transferirse a envases de plástico inmediatamente después de su preparación.

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 2

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido clorhídrico, HCl.

3.2.1 HCl 37% d=1,19 kg/L

3.2.2 HCl 32% d=1,16 kg/L

- 3.3 Ácido clorhídrico 2 mol/L.

Diluir 166 mL de HCl 37% (3.2.1) o 197 mL de HCl 32% (3.2.2) con agua a 1 L.

- 3.4 Solución tampón.

Disolver 250 g de acetato de amonio, CH₃COONH₄, y 15 g de EDTA-disódico (sal disódica del ácido etilendinitrilotetraacético) en 400 mL de agua. Agregar 125 mL de ácido acético 100%, d=1,05 kg/L, y mezclar.

- 3.5 Solución de azometina-H 9 g/L y ácido ascórbico 20 g/L.

Disolver 0,9 g de azometina-H, C₁₇H₁₂NNaO₈S₂, y 2 g de ácido ascórbico, C₆H₈O₆, en 100 mL de agua. Guardar refrigerado en un frasco plástico y reemplazar cada 15 días.

- 3.6 Solución estándar de boro, 1000 mg/L de B.

Disolver 5,715 g de H₃BO₃ en agua y diluir a 1000 mL.

Nota 3

El H₃BO₃ no debe secarse porque pierde agua y se transforma en HBO₂.

- 3.7 Solución estándar de boro, 100 mg/L de B.

Diluir 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de B (3.6) a 100 mL con agua.

- 3.8 Serie de estándares de boro.

A siete matraces aforados de 250 mL agregar:

→ 0-1-2-3-4-5-10 mL de la solución estándar de 100 mg/L de B (3.7),

→ 50 mL de HCl 2 mol/L (3.3),

→ agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene 0,0-0,4-0,8-1,2-1,6-2,0-4,0 mg/L de B.

4 Procedimiento

- 4.1 Tomar una alícuota de 2 mL de los filtrados de la muestra y de los blancos proveniente del Método 2.1, punto 4.5, y de la serie de estándares de boro (3.8) en tubos de plástico.
- 4.2 Agregar 4 mL de solución tampón (3.4). Mezclar.
- 4.3 Agregar 2 mL de solución de azometina (3.5). Mezclar.
- 4.4 Dejar reposar por 30 a 60 minutos pero no más de 90 minutos.
- 4.4 Leer la absorbancia contra agua a 430 nm.

5 Cálculos

- 5.1. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de B en la serie de estándares (3.8) y calcular la ecuación de regresión de mejor ajuste.

Nota 3

El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las determinaciones

- 5.2. Calcular las concentraciones de B en los filtrados de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- 5.3. Calcular la concentración de B en la muestra, en mg/kg, según:

$$B \text{ (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

donde:

- | | | |
|---|---|--|
| a | = | mg/L de B en el filtrado de la muestra |
| b | = | mg/L promedio de B en los filtrados de los blancos |
| V | = | volumen final en mL (Método 2.1, punto 4.6) |
| m | = | masa en g de muestra (Método 2.1, punto 4.1) |

6 Informes

- 6.1 Informar la concentración de B en la muestra en mg/kg sin decimales.

7 Referencias

- 7.1 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

MÉTODO 10 ALUMINIO

10.1 Calcinación y determinación por espectrofotometría de absorción atómica

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.1, se determina la concentración de Al por espectrofotometría de absorción atómica con llama de óxido nitroso-acetileno.

Nota 1

En las muestras que contienen alto Si, parte del Al puede quedar retenido en los silicatos después de la disolución, por lo que la muestra debe digerirse con HF antes del análisis de Al.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) con lámpara de Al.

3 Reactivos

- 3.1 Solución de cloruro de potasio, 2 mol/L
Disolver 149 g de KCl en agua y diluir a 1 L.
- 3.2 Solución estándar de aluminio, 1000 mg/L de Al.
Disponible en el comercio.
- 3.3 Solución estándar de aluminio, 100 mg/L de Al.
Diluir 10 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Al (3.2) con agua a 100 mL.
- 3.5 Serie de estándares de aluminio.
A seis matraces aforados de 100 mL agregar:
- 0-5-10-15-20-25 mL de la solución estándar de 100 mg/L de Al (3.3),
 - 50 mL de solución de KCl 2 mol/L (3.1),
 - agua hasta enrasar.
- Esta serie de estándares contiene 0-5-10-15-20-25 mg/L de Al.

4 Procedimiento

- 4.1 En los filtrado de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.1, punto 4.6, y usando un EAA (2.1) con llama de óxido nitroso-acetileno y calibrado con la serie de estándares de Al (3.4), leer la concentración de Al a 309,3 nm.

5 Cálculos

- 5.1. Calcular la concentración de Al en la muestra, en mg/kg, según:

$$\text{Al (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

donde:

- a = mg/L de Al en el filtrado de la muestra
- b = mg/L promedio de Al en los filtrados de los blancos
- V = volumen final en mL (Método 2.1, punto 4.6)
- m = masa en g de muestra (Método 2.1, punto 4.1)

6 Informes

- 6.1 Informar la concentración de Al en la muestra en mg/kg sin decimales.

7 Referencias

- 7.1 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.

MÉTODO 11 AZUFRE

11.1 Calcinación y determinación por turbidimetría

1 Principio

- 1.1 En el filtrado proveniente de la calcinación según el Método 2.2, se determina la concentración de S-SO₄ por turbidimetría del sulfato de bario.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Espectrofotómetro visible con cubetas de una longitud de paso de luz de 10 mm.

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 1

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido clorhídrico, HCl.

3.2.1 HCl 37% d=1,19 kg/L

3.2.2 HCl 32% d=1,16 kg/L

- 3.3 Ácido clorhídrico 2 mol/L.

Diluir 166 mL de HCl 37% (3.2.1) o 197 mL de HCl 32% (3.2.2) con agua y llevar a 1 L.

- 3.4 Solución de nitrato de magnesio, Mg(NO₃)₂, 95%.

Disolver 950 g de Mg(NO₃)₂.6H₂O en agua y diluir a 1L.

- 3.5 Solución de cloruro de bario-Tween 80.

Disolver 20 g de BaCl₂.2H₂O y 20 mL de Tween 80 en agua y diluir a 100 mL.

- 3.6 Solución estándar de azufre, 1000 mg/L de S.

Disolver 5,435 g de sulfato de potasio, K₂SO₄, seco a 105°C, en agua y diluir a 1 L.

- 3.7 Serie de estándares de S.

A seis matraces aforados de 250 mL agregar:

→ 0-1-2-3-4-5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de S (3.6),

→ 50 mL de ácido clorhídrico 2 mol/L (3.3),

→ 10 mL de la solución de nitrato de magnesio (3.4),

→ agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene 0-4-8-12-16-20 mg/L de S.

4 Procedimiento

- 4.1 Transferir a un recipiente de vidrio una alícuota de 10 mL de los filtrados de la muestra y de los blancos provenientes del Método 2.2, punto 4.8, y de la serie de estándares de S (3.7).
- 4.2 Agregar 1 mL de la solución de cloruro de bario-Tween 80 (3.5) y mezclar.
- 4.3 Dejar reposar 30 minutos.
- 4.4 Agitar y leer la absorbancia contra agua a 440 nm.

Nota 2

Debe leerse antes de 3 horas.

5 Cálculos

- 5.1. Dibujar una curva de calibración con las absorbancias y las concentraciones de S en la serie de estándares (3.7) y calcular la ecuación de regresión de mejor ajuste.

Nota 3

El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las determinaciones

- 5.2. Calcular las concentraciones de S en los filtrados de la muestra y de los blancos por resolución de la ecuación de regresión.
- 5.3. Calcular la concentración de S en la muestra, en % o en g/kg, según:

$$S (\%) = \frac{(a - b) \times 0,005}{m}$$

$$S (\text{g/kg}) = \frac{(a - b) \times 0,05}{m}$$

donde:

- | | | |
|---|---|--|
| a | = | mg/L de S en el filtrado de la muestra |
| b | = | mg/L promedio de S en los filtrados de los blancos |
| m | = | masa en g de muestra (Método 2.2, punto 4.1) |

6 Informes

- 6.1 Informar la concentración de S en la muestra en % con dos decimales o en g/kg con un decimal.

7 Referencias

- 7.1 LACHICA, M., AGUILAR, A. y YÁÑEZ J. 1973. Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental Zaidín. Anales de Edafología y Agrobiología 32:1033-1047.

MÉTODO 12 HIERRO

12.1 Extracción con 1,10-fenantrolina y determinación por espectrofotometría de absorción atómica

1 Principio

- 1.1 La muestra de tejido vegetal fresco se extrae con una solución de 1,10-fenantrolina y en el extracto se determina la concentración de Fe por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).
- 1.2 El Fe extraído se denomina "Fe activo" y corresponde mayoritariamente a formas de hierro ferroso (Fe^{+2}).

Nota 1

El material vegetal, una vez colectado, debe mantenerse refrigerado (no congelado) en bolsa de plástico por no más de dos días antes del análisis.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Tijera de acero inoxidable
- 2.2 Discos de papel filtro de tamaño de poro $\leq 11 \mu\text{m}$
- 2.3 Espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) con lámpara de Fe.

3 Reactivos

- 3.1 Ácido clorhídrico, HCl.
 - 3.1.1 HCl 37% $d=1,19 \text{ kg/L}$
 - 3.1.2 HCl 32% $d=1,16 \text{ kg/L}$
- 3.2 Ácido clorhídrico 1 mol/L.

Diluir 83 mL de HCl 37% (3.1.1) o 98 mL de HCl 32% (3.1.2) con agua y llevar a 1 L.
- 3.3. Solución de 1,10-fenantrolina 1,5% a pH 3,0.
 - 3.3.1 Disolver 15 g de 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$) en alrededor de 850 mL de agua. Agregar ácido clorhídrico 1 mol/L (3.2) con agitación continua hasta ajustar a pH 3,0. Diluir a 1 L.
 - 3.3.2 Disolver 16,5 g de 1,10-fenantrolina monohidrato ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en alrededor de 850 mL de agua. Agregar ácido clorhídrico 1 mol/L (3.2) con agitación continua hasta ajustar a pH 3,0. Diluir a 1 L.
 - 3.3.3 Disolver 19,5 g de 1-10-fenantrolina) clorhidrato ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) en agua y diluir 1 L.
- 3.4. Solución estándar de hierro, 1000 mg/L de Fe.

Disponible en el comercio.
- 3.5. Solución estándar de hierro, 20 mg/L de Fe.

A un matraz aforado de 250 mL agregar:

- 5 mL de la solución estándar de 1000 mg/L de Fe (3.4),
- agua hasta enrasar

3.6. Serie de estándares de Fe.

A seis matraces aforados de 100 mL agregar:

- 0-1-2-5-10-20 mL de la solución estándar de 20 mg/L de Fe (3.5),
- agua hasta enrasar.

Esta serie de estándares contiene 0,0-0,2-0,4-1,0-2,0-4,0 mg/L de Fe.

Nota 2

Si por las características del EAA (2.3) es necesario utilizar otros rangos de concentración para que las lecturas se sitúen en el rango de linealidad, proceder a efectuar las diluciones que sean necesarias, siguiendo como referencia la técnica descrita.

4 Procedimiento

- 4.1 Cortar la muestra de material vegetal fresco y lavado con una tijera (2.1) en trozos de 1 a 2 mm.
- 4.2 Pesar 2 g (exactitud 0,01 g) de muestra (masa: mf_1) y secar en estufa a 70-80°C hasta peso constante (masa: ms).
- 4.3 Pesar otra porción de 2 g (exactitud 0,01 g) de muestra fresca (masa: mf_2) en un recipiente de vidrio de 100 mL. Incluir dos blancos.
- 4.4 Agregar 20 mL de la solución de 1,10-fenantrolina (3.3.1 o 3.3.2 o 3.3.3) y agitar suavemente hasta mezclar bien.
- 4.5 Dejar reposar por 16 hr a temperatura ambiente.
- 4.6 Filtrar a través de un disco filtro (2.2).
- 4.7 Leer la concentración de Fe en los extractos de la muestra y de los blancos en un espectrofotómetro de absorción atómica (2.3), con llama de aire-acetileno y calibrado con la serie de estándares Fe (3.6), a 248,3 nm.

5 Cálculos

- 5.1 Calcular el contenido de agua de la muestra de tejido vegetal fresco, según:

$$\text{agua (\%)} = \frac{mf_1 - ms}{mf_1} \times 100$$

donde:

mf_1 = masa en g de la muestra fresca
 ms = masa en g de la muestra seca

- 5.2 Calcular la concentración de Fe en la muestra de tejido vegetal seco, según:

$$\text{Fe (mg/kg)} = \frac{(a - b) \times V \times 100}{mf_2 (100 - \text{agua}(\%))}$$

donde:

- a = mg/L de Fe en el extracto de la muestra
- b = mg/L promedio de Fe en los blancos
- V = volumen en mL de solución de 1,10-fenantrolina agregada
- mf₂ = masa en g de tejido vegetal fresco

6 Informe

- 6.1 Informar el resultado de Fe extraído de la muestra vegetal fresca con solución de 1,10-fenantrolina, en mg/kg, sin decimales, expresado en base a muestra seca.

7 Referencias

- 7.1 Köseoglu, A.T. and V. Açıkgöz. 1995. Determination of iron chlorosis with extractable iron analysis in peach leaves. *J. Plant Nutr.*, 18(1), 153-161.
- 7.2 Mohammad, M.J., H. Najim and S. Khresat. 1998. Nitric acid and o-phenantroline extractable iron for diagnosis of iron chlorosis in citrus lemon trees. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29(7&8), 1035-1043.
- 7.3 Rashid, A., E. Rafique, J. Din, S.N. Malik and M.Y. Arain. 1997. Micronutrient deficiencies in rainfed calcareous soils of Pakistan. I. Iron chlorosis in the peanut plant. *Común. Soil. Sci. Plant Anal.*, 28(1&2), 135-148.
- 7.4 Sadzawka R., A, R. Ruiz S. y J. Villanueva A. 2000. Estimación del Fe(II) foliar para el diagnóstico de la clorosis férrica en plantas. 51 Congreso Agronómico de Chile. Universidad de Talca, Talca (Chile). 7-10 noviembre 2000, p.55
- 7.5 Villanueva A., J. 1992. Desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de la clorosis férrica en plantas. Tesis Químico Laboratorista, Instituto Profesional de Santiago, Escuela de Tecnología, Santiago, Chile, 74p.

MÉTODO 13 CLORURO

13.1 Extracción con HNO₃ 0,3 mol/L y determinación por titulación potenciométrica

1 Principio

- 1.1 Al tejido vegetal seco y molido se le agrega HNO₃ 0,3 mol/L y se determina el Cl liberado por titulación potenciométrica con una solución de AgNO₃.

Nota 1

Este método de determinación de Cl también puede aplicarse en el filtrado de la extracción con agua (Método 4.1) o de la extracción con ácido acético 2% (Método 4.2), previa acidificación con HNO₃.

2 Equipos y materiales especiales

- 2.1 Medidor de pH/mV que permita un rango de -500 mV a +500 mV con una precisión de al menos 1 mV.
- 2.2 Electrodo: indicador de Ag y de referencia de Hg/Hg₂SO₄ con K₂SO₄ saturado
- 2.3 Agitador magnético con magnetos
- 2.4 Bureta de 10 mL con una precisión de 0,01 mL

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 2

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3) y Procedimiento (4).

- 3.2 Ácido nítrico, HNO₃, 65%, d=1,41 kg/L.
- 3.3 Ácido nítrico 0,3 mol/L
Diluir 21 mL de HNO₃ (3.2), con agua a 1 L.
- 3.4 Solución de nitrato de plata 0,05 mol/L.
- 3.4.1 Disponible en el comercio
- 3.4.2 Disolver 8,50 g de AgNO₃ en agua y diluir a 1000 mL. Estandarizar según 5.2.
- 3.5 Solución estándar de cloruro de sodio, 0,05 mol/L.
- 3.5.1 Disponible en el comercio
- 3.5.2 Disolver 2,922 g de NaCl, secado a 200°C por 24 horas, en agua y diluir a 1000 mL.

4 Procedimiento

Determinación del potencial del punto de equivalencia

- 4.1 A tres vasos de 100 mL agregar:
- 1–2-5 mL de solución estándar de NaCl 0,05 mol/L (3.5.1 o 3.5.2)
 - 40 mL de solución de HNO₃ 0,3 mol/L (3.3)
 - un magneto
- 4.2 Insertar los electrodos (2.2) en la solución hasta una profundidad de 2 cm y encender el agitador (2.3) de manera de mantener una agitación suave constante.
- 4.3 Registrar las lecturas de la bureta en mL y del voltaje en mV.
- 4.4 Agregar lentamente solución de AgNO₃ 0,05 mol/L (3.4.1 o 3.4.2) hasta alrededor de 0,3 mL antes del punto de equivalencia esperado y registrar las lecturas de la bureta y del voltaje.
- 4.5 Continuar titulando en incrementos de 2 gotas de solución de AgNO₃, registrando cada vez las lecturas de la bureta y del voltaje, hasta alrededor de 0,3 mL después del punto de equivalencia.
- 4.6 Calcular el voltaje del punto de equivalencia según 5.1 a 5.3.

Medición de la concentración de Cl en la muestra

- 4.7 Pesar 1 g (exactitud 0,01 g) de muestra seca y molida en un vaso de 100 mL.
- Nota 3**
También pueden usarse 40 mL del filtrado de la extracción con agua (Método 4.1) o 40 mL de la extracción con ácido acético 2% (Método 4.2), agregando 1 mL de HNO₃ (3.2), un magneto y continuando con el punto 4.9.
- 4.8 Agregar 40 mL de solución de de HNO₃ 0,3 mol/L (3.3) y un magneto.
- 4.9 Introducir los electrodos e iniciar la agitación.
- 4.10 Agregar lentamente solución de AgNO₃ 0,05 mol/L (3.4.1 o 3.4.2) hasta alcanzar el punto de equivalencia determinado en 5.3.
- Nota 4**
El electrodo de Ag debe limpiarse frecuentemente usando un abrasivo para Ag.

5 Cálculos

Determinación del potencial del punto de equivalencia

- 5.1 Confeccionar, para cada alícuota de solución estándar de NaCl, una tabla con los siguientes valores (ver ejemplo 8.1):
- volumen (V), en mL, de cada lectura de solución de AgNO₃
 - diferencia de volumen (ΔV), en mL, entre dos lecturas sucesivas
 - potencial (E), en mV, de cada lectura
 - diferencia de potencial (ΔE), en mV, entre dos lecturas sucesivas
 - cambio de potencial por unidad de cambio en el volumen de AgNO₃ ($\Delta E/\Delta V$, es decir, la primera derivada)
 - diferencia entre los valores sucesivos de la primera derivada ($\Delta^2 E/\Delta V$)
- 5.2 Calcular, para cada alícuota de solución estándar de NaCl, el potencial en el punto de equivalencia según (ver ejemplo 8.2):

$$E_e = E_p + \Delta E_p \times \frac{\Delta 2E(+)}{\Delta 2E(+) + \Delta 2E(-)}$$

donde:

E_e	=	potencial, en mV, en el punto de equivalencia
E_p	=	potencial, en mV, correspondiente al último valor positivo de $\Delta 2E/\Delta V$
ΔE_p	=	diferencia de potencial, en mV, entre el último valor positivo y el primer valor negativo de $\Delta 2E/\Delta V$
$\Delta 2E(+)$	=	último valor positivo de $\Delta 2E/\Delta V$
$\Delta 2E(-)$	=	primer valor negativo de $\Delta 2E/\Delta V$

- 5.3 Definir el potencial en el punto de equivalencia como el promedio de los valores de E_e obtenidos para las tres alícuotas de solución estándar de NaCl.

Estandarización de la solución de $AgNO_3$ (3.4.2).

- 5.4 Calcular, para cada alícuota de solución estándar de NaCl, el volumen de solución de $AgNO_3$ gastado en alcanzar el punto de equivalencia según (ver ejemplo 8.3.1):

$$V_e = V_p + \Delta V_p \times \frac{\Delta 2E(+)}{\Delta 2E(+) + \Delta 2E(-)}$$

donde:

V_e	=	gasto, en mL, de solución de $AgNO_3$ en el punto de equivalencia
V_p	=	gasto, en mL, correspondiente al último valor positivo de $\Delta 2E/\Delta V$
ΔV_p	=	diferencia de volumen, en mL, alrededor del punto de equivalencia (correspondiente a ΔE_p)
$\Delta 2E(+)$	=	último valor positivo de $\Delta 2E/\Delta V$
$\Delta 2E(-)$	=	primer valor negativo de $\Delta 2E/\Delta V$

- 5.5 Dibujar una curva de calibración con las alícuotas, en mL, de solución estándar de NaCl en el eje X y los gastos, en mL, calculados de solución de $AgNO_3$ en el eje Y (ver ejemplo 8.3.2).
- 5.6 Calcular la ecuación de regresión lineal del tipo: $y = b_1x + b_0$.

Nota 5

El coeficiente de regresión, R^2 , debe ser $> 0,99$. De lo contrario, repetir las titulaciones

- 5.7 Calcular la concentración de la solución de $AgNO_3$ según (ver ejemplo 8.3.3):

$$AgNO_3(\text{mol/L}) = \frac{0,05}{b_1}$$

donde:

0,05	=	concentración, en mol/L, de la solución estándar de NaCl
------	---	--

b1 = pendiente de la ecuación de regresión lineal (5.6)

Cálculo de la concentración de cloruro en la muestra (ver ejemplo 8.4)

5.8 Calcular la concentración de Cl, expresada en mmol/kg, según:

$$\text{Cl (mmol / kg)} = \frac{(a - b_0) \times M}{m} \times 1000$$

donde:

- a = gasto, en mL, de la solución de AgNO₃
- b₀ = intercepto de la ecuación de regresión (5.6)
- M = concentración, en mol/L, de la solución de AgNO₃ (5.7)
- m = masa, en g, de la muestra

5.9 Calcular la concentración de Cl, expresada en g/kg, según:

$$\text{Cl (g / kg)} = \frac{(a - b_0) \times M}{m} \times 35,5$$

donde:

- a = gasto, en mL, de la solución de AgNO₃
- b₀ = intercepto de la ecuación de regresión (5.6)
- M = concentración, en mol/L, de la solución de AgNO₃ (5.7)
- m = masa, en g, de la muestra

6 Informes

6.1 Informar la concentración de Cl en la muestra en mmol/kg sin decimales o en g/kg con dos cifras significativas.

7 Referencias

7.1 WALINGA, I., VAN DER LEE, J.J., HOUBA, V.J.G., VAN VARK, W. and NOVO-ZAMSKY, I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253p.

8 Ejemplos

8.1 Ejemplo de valores obtenidos en la titulación de 1 mL de solución de NaCl 0,05 mol/L con solución de AgNO₃

V	ΔV	E	ΔE	ΔE/ΔV	Δ ² E/ΔV
AgNO ₃ mL	Diferencia de volumen mL	Potencial mV	Diferencia de potencial mV	Primera derivada	Diferencia en la primera derivada
0,00		-236			
	0,70		31	44	
0,70		-205			+67
	0,09		10	111	
0,79		-195			+56
	0,09		15	167	
0,88		-180			+322
	0,09		44	489	
0,97		-136			+178
	0,09		60	667	
1,06		-76			-467
	0,09		18	200	
1,15		-58			-78
	0,09		11	122	
1,24		-47			-44
	0,09		7	78	
1,33		-40			

8.2 Ejemplo del cálculo del potencial en el punto de equivalencia

$$E_e = -136 + 60 \times \frac{178}{178 + 467}$$

$$E_e = -119 \text{ mV}$$

8.3 Ejemplo del cálculo de la concentración de la solución de AgNO₃

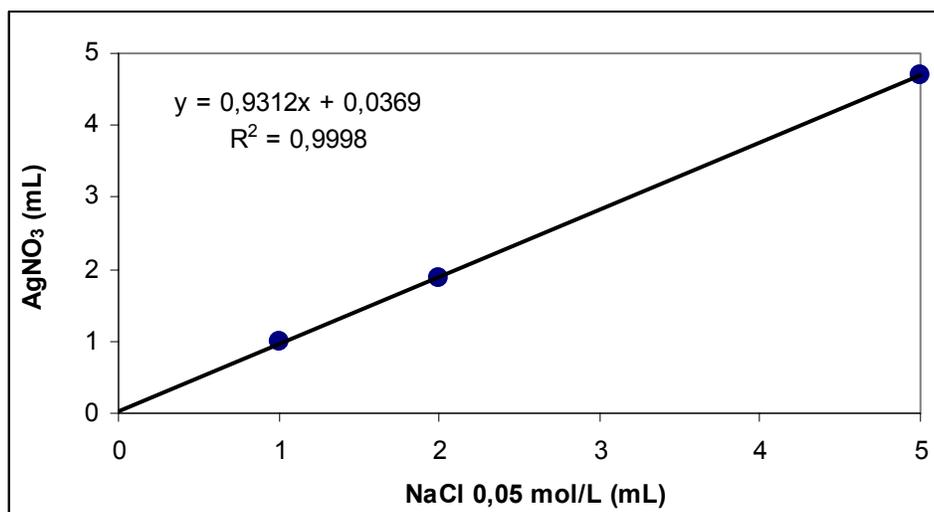
8.3.1 Cálculo del gasto de solución de AgNO₃ en la titulación de 1 mL de solución de NaCl 0,05 mol/L

$$V_e = 0,97 + 0,09 \times \frac{178}{178 + 467}$$

$$V_e = 0,99 \text{ mL}$$

8.3.2 Ejemplo de la curva de calibración

NaCl 0,05 mol/L alícuota mL	AgNO ₃ gasto calculado mL
1	0,99
2	1,87
5	4,70

8.3.3 Cálculo de la concentración de la solución de AgNO₃

$$\text{AgNO}_3 (\text{mol/L}) = \frac{0,05}{0,9312} = 0,054$$

8.4 Ejemplo del cálculo de la concentración de Cl en una muestra

$$\text{Cl (mmol/kg)} = \frac{(2,84 - 0,0369) \times 0,054}{1,05} \times 1000 = 144$$

$$\text{Cl (g/kg)} = \frac{(2,84 - 0,0369) \times 0,054}{1,05} \times 35,5 = 5,1$$

MÉTODO 14 NITRATO

14.1 Extracción con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y determinación con electrodo selectivo de ión nitrato

1 Principio

- 1.1 El tejido vegetal seco y molido se extrae con una solución de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y en el extracto se determina la concentración de N-NO_3 con un electrodo selectivo de ión nitrato.

Nota 1

Este método de determinación también puede aplicarse en el filtrado de la extracción con agua (Método 4.1).

2 Equipos y materiales especiales

- 2.5 Agitador recíproco.
2.6 Papel filtro de tamaño de poro $< 3 \mu\text{m}$
2.7 Medidor de pH/mV con una precisión de al menos 0,1 mV.
2.8 Electrodo: indicador selectivo de ión nitrato y de referencia de $\text{Hg/Hg}_2\text{SO}_4$ con K_2SO_4 saturado.
2.9 Agitador magnético con magnetos

3 Reactivos

- 3.1 Agua destilada con una conductividad específica no mayor de 0,2 mS/m a 25°C y un pH mayor de 5,6.

Nota 2

Usar agua de esta calidad en Reactivos (3)

- 3.2 Solución de hidróxido de sodio 0,1 mol/L
Disolver 1 g de NaOH en agua y diluir a 250 mL.
3.3 Solución para el ajuste de la fuerza iónica.

A un matraz aforado de 1000 mL agregar:

- alrededor de 800 mL de agua
- 13,3 g de sulfato de aluminio, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, y disolver,
- 3,12 g de sulfato de plata, Ag_2SO_4 , y disolver,
- 1,24 g de ácido bórico, H_3BO_3 , y disolver,
- 1,9 g de ácido amidosulfúrico, NH_2HSO_3 y disolver
- solución de NaOH 0,1 mol/L hasta pH 3,0,
- agua hasta enrasar

Esta solución contiene $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,02 mol/L, Ag_2SO_4 0,01 mol/L, H_3BO_3 0,02 mol/L y NH_2HSO_3 0,02 mol/L. Almacenar en la oscuridad.

- 3.4 Solución para la extracción
Diluir 500 mL de la solución 3.3 con agua a 1 L.
- 3.5 Solución estándar de 100 mg/L de N-NO₃.
Disolver 0,722 g de nitrato de potasio, KNO₃, secado a 105°C por 24 hr, en agua y diluir a 1000 mL.
- Nota 3**
Si se agregan 2 mL/L de tetracloruro de carbono, CHCl₃, esta solución es estable por 6 meses.
- 3.6 Solución estándar de 25 mg/L de N-NO₃
Diluir 25 mL de la solución estándar de 100 mg/L de N-NO₃ (3.5) con agua a 100 mL.
- 3.7 Serie de soluciones estándares de 0-10 mg/L de N-NO₃
A cinco matraces aforados de 25 mL agregar:
→ 0-1-2-5-10 mL solución estándar de 25 mg/L de N-NO₃ (3.6),
→ 12,5 mL de solución 3.3 y
→ agua hasta enrasar.
Esta serie contiene 0-1-2-5-10 mg/L de N-NO₃.
- 3.8 Serie de soluciones estándares de 0-40 mg/L de N-NO₃
A cinco matraces aforados de 25 mL agregar:
→ 0-1-2-5-10 mL solución estándar de 100 mg/L de N-NO₃ (3.5),
→ 12,5 mL de solución 3.3 y
→ agua hasta enrasar.
Esta serie contiene 0-4-8-20-40 mg/L de N-NO₃.

4 Procedimiento

- 4.1 Pesar entre 0,5 g y 1 g (exactitud 0,001 g) de muestra seca y molida en un recipiente agitable de 50 mL. Incluir dos blancos y una muestra de referencia.
- Nota 4**
También se puede usar una alícuota de 10 mL del filtrado de la extracción con agua (Método 4.1), agregando 10 mL de solución 3.3 y continuando con el punto 4.5.
- 4.2 Agregar 25 mL de solución 3.4.
- 4.3 Agitar durante 30 minutos en un agitador recíproco (2.1).
- 4.4 Filtrar y, si el extracto sale turbio, volver a filtrar por el mismo papel filtro (2.2).
- 4.5 Agregar un magneto y agitar suavemente
- 4.6 Introducir los electrodos (2.4) y leer el potencial en el medidor de pH/mV (2.3) una vez que la lectura se estabilice (después de alrededor de 1 min).
- 4.7 Similarmente leer el potencial de la serie de soluciones estándares (3.7 o 3.8 dependiendo del rango de las muestras)

Nota 5

Todas las determinaciones deben realizarse a temperatura constante.
Verificar la curva de calibración (5.1) cada tres muestras usando una solución estándar de N-NO₃ de concentración cercana a la de las muestras.

5 Cálculos

5.1 Dibujar la curva de calibración con las concentraciones de N-NO₃ de la serie de estándares (3.7 o 3.8) en el eje X logarítmico y el potencial medido en mV en el eje Y lineal.

5.2 Calcular la ecuación de regresión.

Nota 6

El coeficiente de regresión, R², debe ser > 0,99. De lo contrario, repetir las determinaciones

5.3 Calcular las concentraciones de N-NO₃ en el extracto de la muestra y en los blancos por resolución de la ecuación de regresión.

5.4 Calcular la concentración de N-NO₃ la muestra, en mmol/kg o mg/kg, según:

$$\text{N-NO}_3 \text{ (mmol/kg)} = \frac{(a-b) \times V}{m \times 14}$$

$$\text{N-NO}_3 \text{ (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times V}{m}$$

donde:

- a = mg/L de N-NO₃ en el extracto de la muestra
- b = mg/L promedio de N-NO₃ en los blancos
- V = volumen, en mL, de solución 3.2 agregada
- m = masa, en g, de la muestra

Nota 6

Si la determinación se realizó en el filtrado de la extracción con agua (ver Nota 4), calcular la concentración de N-NO₃ la muestra, en mmol/kg o mg/kg, según:

$$\text{N-NO}_3 \text{ (mmol/kg)} = \frac{(a-b) \times V_a}{m_a \times 14} \times 2$$

$$\text{N-NO}_3 \text{ (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times V_a}{m_a} \times 2$$

donde:

- a = mg/L de N-NO₃ en el extracto de la muestra
- b = mg/L promedio de N-NO₃ en los blancos
- V_a = volumen, en mL, de agua agregada (Método 4.1, punto 4.2)
- m_a = masa, en g, de la muestra (Método 4.1, punto 4.1)

6 Informes

6.1 Informar los resultados de N-NO₃ en mmol/kg con dos cifras significativas o en mg/kg sin decimales.

7 Referencias

- 7.1 FRANSON, M.A.H. (Ed) 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C., USA, p. 4-116.
- 7.2 KALRA, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.