

# Modificación de una técnica de análisis de azufre en tejido foliar

## Modification of a technique for sulfur analysis on leaf tissue

Ménica Cuéllar S. <sup>1</sup>; Rodrigo Lora S. <sup>2</sup>; Fernando Munévar M. <sup>3</sup>

### RESUMEN

El análisis de azufre (S) en tejido foliar consiste en la mineralización de la muestra y posterior determinación del elemento como tal. Esta técnica presenta algunos problemas de reproducibilidad de los resultados, debido a fallas en la etapa de mineralización (destrucción de la materia orgánica). En Colombia, la mayoría de laboratorios que analizan azufre en tejido foliar, utilizan una digestión vía húmeda, la cual usa reactivos altamente tóxicos y peligrosos. El método turbidimétrico es el más utilizado para esta determinación, el cual se basa en la formación de un precipitado de sulfato de bario y posterior cuantificación espectrofotométrica. Al buscar métodos alternativos para este análisis, se encuentran algunos que involucran equipos que requieren de una gran inversión de recursos, como equipos de análisis elemental, espectrofotometría de fluorescencia de rayos X, cromatografía iónica y espectrofotometría de plasma, entre otros. Por tal razón se decidió buscar un método alternativo en el que se utilicen equipos ya existentes en el laboratorio de Cenipalma, de fácil aplicación en labores de rutina y de bajo costo. Para esto se tomó como base el método descrito por Jones (1995), el cual involucra una mineralización vía seca (calcinación) y la determinación del S por el método tradicional, haciendo algunas modificaciones. En este estudio se utilizó una muestra de referencia de tejido foliar de la Universidad de Wageningen(UW) a la cual se le conoce el contenido de S. Se evaluaron variables del proceso de digestión como tiempo de predigestión, cantidad de modificador de matriz, temperatura de precalcinación y tiempo de calcinación. Con estos resultados se estandarizó la metodología de análisis de S en tejido foliar. De esta forma, el Laboratorio de Análisis Foliare y de Suelos de Cenipalma cuenta con una metodología de análisis de S. Los resultados encontrados al implementar esta metodología muestran su exactitud, ya que el valor promedio encontrado durante los años 1999 y 2000 es igual al valor reportado por la WEPAL (Wageningen Evaluating Program for Analytical Laboratories). En cuanto a la precisión, ésta ha aumentado, encontrándose una disminución en el coeficiente de variación de 10,9% a 8,5%, el cual se encuentra muy cercana al 8% reportado por la WEPAL.

### SUMMARY

Sulfur analysis on leaf tissue is made up of a sample mineralization first and then the determination as such. The most used method for the determination is the turbidimetric, which is based in the formation of a barium sulfate precipitate and a subsequent spectrophotometric quantification. This technique poses some problems regarding the reproducibility of the results, because of the failures in the mineralization stage (organic material destruction). In Colombia, a humid digestion is performed which utilizes highly toxic and dangerous substances.

- 1 Química. Investigador Asistente, Cenipalma, Apartado Aéreo 252171. Bogotá, D.C. Colombia.
- 2 Ing. Químico. Asesor. Cenipalma, Apartado Aéreo 252171. Bogotá, D.C. Colombia.
- 3 Ing. Agrónomo, Ph. D. Líder Área de Manejo de Suelos y Aguas, Cenipalma. Apartado Aéreo 252171. Bogotá, D.C. Colombia.

When seeking for alternatives for this analysis, some methods are found which involve equipment that requires a great resource investment such as elemental analysis equipment, X ray fluorescence spectrophotometry, ionic chromatography, and plasma spectrophotometry. Consequently, it was decided to seek for an alternative method that uses existing lab equipment, of easy use in routine and low cost labors. For this, the method described by J.B. Jones was selected as a basis, which involves a dry mineralization and determination by the traditional method. The necessary adjustments were made. In this study a reference sample of leaf tissue of the Agricultural University of Wageningen (AUW)- which is known for its high sulfur (S) content - was used. Variables of the digestive process were evaluated, such as: quantity of reactive used in the pre-digestion, pre-digestion time, calcination time, and reactive for dissolution. In the determination the quantities of BaCl<sub>2</sub> and seed solution as well as its relation with the solution of the sample, and the time of formation of the precipitate. With these results, the sulfur analysis in leaf tissue was standardized. By this means the Soil and Leaf Analysis Laboratory of Cenipalma has a methodology for sulfur analysis. The obtained results when implementing the methodology show their accuracy, given that the average value found during 1999 and 2000 is equal to the value reported by the pattern. Regarding precision, this has diminished in relation to the previous year from 10.9% to 8.5% which is very close to the one reported by the AUW of 8%.

Palabras claves: Azufre, Análisis foliar.

## INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de azufre (S) se presentan en muchos cultivos alrededor del mundo, debido a la disminución del contenido de S en los fertilizantes, a la reducción de la deposición atmosférica y al uso extensivo de las tierras en cultivos que requieren grandes cantidades de S para su sostenimiento (Tabatabai 1996). Las deficiencias de S en la planta se pueden presentar como un amarillamiento en el follaje, iniciando en los tejidos jóvenes de la planta. Sin embargo, los síntomas de deficiencia de S se pueden confundir con otras deficiencias más comunes, como lo es la deficiencia de N, especialmente en el período de crecimiento y desarrollo de la planta (Jones 1995). En algunos casos, la deficiencia no se expresa de forma visual, por lo cual es necesario determinar el contenido de S en la planta. Por este motivo, es de gran importancia contar con métodos analíticos que permitan conocer la concentración del elemento en la planta y de esta forma confirmar su deficiencia o exceso, según sea el caso.

Aunque existe un gran número de procedimientos disponibles para determinar la concentración de S en el tejido foliar, el más utilizado es el turbidimétrico, el cual está basado en la formación de un precipitado de sulfato de bario (Tabatabai y Bremner 1970). En los últimos años se han propuestos varios métodos instru-

mentales para facilitar y automatizar la determinación de S en tejido foliar, tal como el de combustión automática de LECO, espectrometría fluorescente de rayos X, la cromatografía iónica o el equipo de plasma (Tabatabai 1996). Sin embargo, el que un laboratorio implemente cualquiera de estas técnicas lleva consigo una considerable inversión. Por esto se buscaron metodologías alternativas para la cuantificación de este elemento, como el procedimiento propuesto por Jones (1995), el cual utiliza equipos con los cuales cuenta el laboratorio de Cenipalma. El método propuesto consiste en la digestión vía seca del tejido foliar, utilizando un modificador de matriz para evitar que el S se pierda durante la calcinación (Jones 1995). Luego de obtener el tejido calcinado, se determina el contenido de S utilizando el método de formación de un precipitado con BaSO<sub>4</sub> (Tabatabai y Bremner 1970). Al utilizar la técnica propuesta por Jones se encontraron diferencias entre el valor esperado para una muestra de referencia de tejido foliar de palma de aceite y los resultados obtenidos en el laboratorio. Los ensayos preliminares mostraron que en la etapa de determinación no hay inconvenientes, ya que se evaluó la curva de calibración con patrones analíticos de concentración conocida y se obtuvieron los resultados esperados, lo que indicó que la limitación estaba en la etapa de

mineralización. El objetivo de este estudio fue evaluar las condiciones de calcinación del tejido foliar para la determinación de S y optimizarlas para obtener resultados exactos y precisos con respecto al valor esperado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis Foliar y de Suelos de Cenipalma. Como muestra de referencia se utilizó una muestra de tejido foliar de palma de aceite (IPE 488) que tiene una concentración de S de 0,188%, adquirida en la red WEPAL de la Universidad de Wageningen en Holanda. Todos los ensayos se realizaron con 15 repeticiones.

### Reactivos

Como reactivos se emplearon: Nitrato de magnesio al 50% [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ]; Agua regia al 20% : 50 ml de  $\text{HNO}_3$   $d=1,40$  g/ml más 150 ml de HCl  $d=1,19$  g/ml en 1.000 ml de agua destilada; Solución estándar de azufre de 1.000 ppm: a partir de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ; Solución semilla de S: Obtenida adicionando a 65 ml de  $\text{HNO}_3$   $d=1,19$  g/ml; 250 ml de ácido acético glacial en 500 ml de agua destilada. Se adicionan 2 ml de solución estándar de 1.000 ppm de S y se completa a un litro; Solución de  $\text{BaCl}_2$ : Se disuelven 20 g de polivinil pirrolidina (PVP) en 300 ml con agua destilada caliente, cuando esté disuelta fría se adicionan 150 g de  $\text{BaCl}_2$  y se completa a un litro con agua destilada.

### Procedimiento de calcinación del tejido foliar para análisis de S

El procedimiento de calcinación utilizado por Jones (1995) se tomó como base, y este consistió en:

Pesar aproximadamente 0,5 g de tejido foliar (secado previamente a  $80^\circ\text{C}$ ) en un vaso de precipitados de 100 ml. Adicionar gota a gota  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  hasta que el tejido se encuentre completamente humedecido. Este reactivo se utiliza como modificador de matriz, para prevenir las pérdidas de S del tejido durante la calcinación. Dejar en reposo 15 min. Colocar el

vaso de precipitados en la plancha de calentamiento a  $100^\circ\text{C}$  hasta que el tejido quede completamente seco. Calcinarse el tejido foliar a  $500^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Cuando el residuo estuvo blanco se sacó de la mufla y se dejó enfriar. Cuidadosamente se adicionaron 10 ml de agua regia al 20% y se completó a volumen (100ml) con agua destilada. El residuo debe disolverse fácilmente y la solución debe ser incolora. Si la solución no es clara, esto indica que el procedimiento de digestión no ha sido completo y se debe repetir este paso.

Acorde con las observaciones preliminares se realizaron los siguientes ensayos:

1. Determinación de la cantidad de modificador de matriz: Se ensayaron tres volúmenes (3, 4 y 5 ml), que humedecieran completamente el tejido y además se evaluó la cantidad propuesta por Jones (1995) .
2. Determinación del tiempo de predigestión: se evaluaron tres niveles (15 min, 4 y 8 horas), dejando constante el peso de la muestra, la cantidad de modificador de matriz y el tiempo de calcinación.
3. Determinación de la temperatura de precalcínación: Se evaluó cualitativamente la temperatura de precalcínación y el tipo de recipiente a utilizar para evitar pérdidas de tejido foliar por proyección.
4. Determinación del tiempo de calcinación: Se evaluaron los tiempos propuestos por Jones (1995) de 4 horas y 8 horas.

### Procedimiento de determinación de S

Se utilizó el método turbidimétrico modificado por Cenipalma a partir del procedimiento de Tabatabai y Bremner (1970), en el cual se forma un precipitado de  $\text{Ba}(\text{SO}_4)_2$ . El procedimiento consistió en tomar 5 ml de la solución anterior en un tubo de ensayo de 15 ml, se adicionaron 2 ml de solución de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) y 2 ml de solución semilla. Luego de tapar los tubos se agitaron y dejaron en reposo durante 40 minutos; 5 minutos antes de leer, se agitó suavemente la solución y luego se leyó en un

espectrofotómetro UV/VIS Lambda 10 Marca Perkin Elmer a 420 nm. A las soluciones patrón que conforman la curva de calibración se les realizó el mismo procedimiento. La curva de calibración se construyó con patrones para de concentración 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppm, para lo cual se tomó, respectivamente, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 y 3,0 ml de la solución estándar de 1.000 ppm de S en balones aforados de 100 ml y se completó a volumen con agua destilada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo preliminar

Al realizar el análisis de S utilizando las mismas condiciones del método propuesto por Jones (1995) no se obtuvieron resultados reproducibles, y en la mayoría de los casos, los resultados se encontraban un 50% por debajo del esperado (no se presentan los datos). Se descartó la etapa de determinación como causa, ya que ésta fue probada con patrones analíticos, obteniéndose excelentes resultados.

### Determinación del tiempo de predigestión

El tiempo de predigestión tiene como finalidad hacer que reaccionen completamente el reactivo utilizado como modificador de matriz  $[Mg(NO_3)_2]$  y el tejido foliar. Al observar las muestras luego de los 15 min propuestos, se encontró que no eran completamente homogéneas. Los resultados encontrados al evaluar los diferentes tiempos de predigestión, muestran que se recuperó una mayor cantidad de S al dejar el tejido en contacto con el modificador de matriz por 8 horas (Tabla 1). Aunque este valor se encuentra por debajo del esperado, los resultados fueron reproducibles, lo cual indica

Tabla 1. Porcentaje de S obtenido para la muestra de referencia al variar el tiempo de predigestión.

| Tiempo (min)   | % S obtenido | C.V.(%) |
|----------------|--------------|---------|
| 15             | 0,051        | 6,6     |
| 240            | 0,052        | 7,2     |
| 480            | 0,133        | 6,8     |
| Valor esperado | 0,188        | 8,0     |

que se requería ajustar las otras condiciones de la calcinación.

### Determinación de la cantidad de modificador de matriz

Una de las condiciones de la técnica bajo estudio que está más sujeta al criterio del analista es la cantidad de modificador de matriz utilizado para la calcinación. En este paso se recomienda la adición gota a gota del  $Mg(NO_3)_2$  hasta que el tejido se humedezca. Al medir este volumen en ninguno de los casos fue inferior a 2 ml, por lo cual se tomó como punto de partida 3 ml. Teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior, donde se notaba claramente una pérdida del S durante la calcinación, se decidió estudiar el efecto de adicionar en exceso el modificador de matriz sobre la concentración de S. Las cantidades utilizadas durante este ensayo se determinaron observando el grado de impregnación del tejido con el nitrato de magnesio, siendo 4 ml la cantidad más apropiada. Se utilizó un tiempo de predigestión de 8 horas como mínimo. Al utilizar 4 ml de  $Mg(NO_3)_2$  se obtuvo una concentración muy cercana al valor esperado y además el coeficiente de variación (0,13%) fue bajo (Tabla 2).

Ensayos posteriores muestran que 4 ml de  $Mg(NO_3)_2$  es la cantidad apropiada para muestras que contienen un amplio rango en el contenido de S (entre 0 y 0,40%).

### Determinación de la temperatura de precalcinación

El paso de precalcinación es importante durante la etapa de mineralización, ya que éste evita que

Tabla 2. Porcentaje de S obtenido para la muestra de referencia al cambiar el volumen de modificador de matriz utilizado.

| Volumen de $Mg(NO_3)_2$ (ml) | % S   | C.V.(%) |
|------------------------------|-------|---------|
| Gota a gota                  | 0,102 | 1,62    |
| 3                            | 0,193 | 0,90    |
| 4                            | 0,187 | 0,13    |
| 5                            | 0,175 | 3,17    |
| Valor esperado               | 0,188 | 8,00    |

haya pérdidas por proyección del tejido foliar al aumentar la temperatura en la mufla. Esta precalcinción debe realizarse en una plancha de calentamiento a una temperatura que permita el secado de la muestra evitando proyecciones del tejido foliar. Los resultados de este ensayo son producto de la observación de las muestras durante la calcinación, encontrándose que recipientes de boca angosta, como erlenmeyers de vidrio que resistan temperaturas de 500°C, evitan la pérdida del tejido foliar. Las observaciones indicaron que la temperatura a utilizar en la plancha de calentamiento debe ser menor de 30°C, esto con el fin de evitar que la muestra se seque superficialmente. El residuo debe quedar totalmente seco.

### Determinación del tiempo de calcinación

El tiempo de calcinación se determinó por observación del tejido, teniendo como punto final la obtención de un residuo completamente blanco sin puntos negros. Los resultados encontrados mostraron que 4 horas fueron insuficientes para calcinar completamente el tejido foliar y que el tiempo mínimo requerido es de 8 horas, al igual que el tiempo de calcinación reportado para la digestión de B(ICA 1989).

### Metodología ajustada

Acorde con los resultados encontrados en los ensayos anteriores, las condiciones que se

encontraron adecuadas para el análisis de S en tejido foliar de palma de aceite fueron:

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| Cantidad de solución de $Mg(NO_3)_2$ | 4 ml             |
| Tiempo de predigestión               | 8 horas          |
| Temperatura de precalcinción         | Inferior a 30 °C |
| Tiempo de calcinación                | 8 horas          |

### Evaluación de la técnica a través del tiempo

El seguimiento de la metodología se ha realizado utilizando el cuadro de control de la media, el cual se construye con los valores reportados por la Universidad de Wageningen. La construcción del cuadro de control consiste en la determinación de los límites de seguridad, definidos como el valor medio más o menos una desviación estándar y los límites de acción, definidos como el valor medio más o menos dos desviaciones estándar (van Reeuwijk 1997). Cuando una metodología se encuentra bajo control, se espera que los resultados reportados para la muestra de referencia, en las diferentes tandas de análisis, estén dentro de los límites de seguridad, tal como se observa al ingresar los valores de 15 tandas de análisis en el cuadro de control (Fig. 1).

Esta metodología de análisis de azufre se ha utilizado en el Laboratorio de Cenipalma durante dos años, con buenos resultados, de tal forma que los valores medios obtenidos para todas las

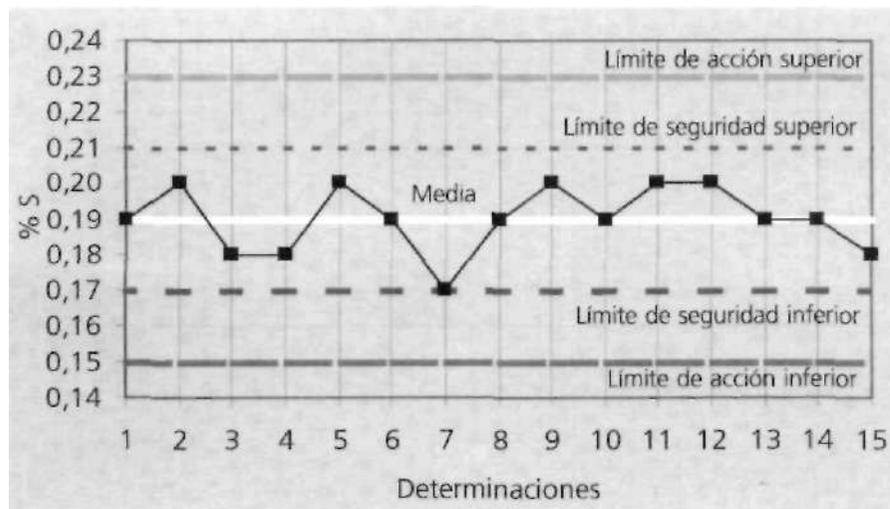


Figura. 1. Cuadro de control de la media para azufre.

determinaciones que se han realizado durante el año 2000 son iguales al valor reportado por la WEPAL. El coeficiente de variación muestra una disminución a través del tiempo, lo cual indica la precisión del análisis (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos para S a través del tiempo.

|                        | Media | No. de análisis | Coefficiente de Variación (%) |
|------------------------|-------|-----------------|-------------------------------|
| 1999                   | 0,180 | 33              | 10,9                          |
| 2000                   | 0,188 | 100             | 8,53                          |
| Valor esperado (WEPAL) | 0,188 | 52              | 8,00                          |

## CONCLUSIONES

**Se estandarizó la técnica de azufre foliar con los recursos con que cuenta el laboratorio de Cenipalma, disminuyendo los riesgos operacionales que tiene la técnica tradicional.**

**La técnica puede ser incorporada a los servicios que presta el laboratorio y así aporta una herramienta adicional para el diagnóstico nutricional de la palma de aceite.**

## BIBLIOGRAFIA

- ICA. 1989. El análisis de suelo, plantas y aguas para riego. ICA, Santafé de Bogotá. 253p. (Manual de Asistencia Técnica No. 47).
- JONES, J.B. 1995. Determining total sulphur in plant tissue using the HACH kit spectrophotometer technique. Sulphur in Agriculture (Estados Unidos) v.19, p.58-62.
- TABATABAI, M.A.: BREMNER, J.M. 1970. A simple turbidimetric method of determining total sulphur in plant materials. Agronomy Journal (Estados Unidos) v.62, p.805-806.
- TABATABAI, M.A. 1996. Sulfur. *In*: D.L. Sparks, (ed.). Methods of soils analysis. Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of American Society of Agronomy. Madison. p. 921 - 960.
- VAN REEUWIJK, LP. 1997. Guidelines for good laboratory practice in soil and plant laboratories. International Soil Reference and Information Centre, Wageningen. Holanda. 135p.