EL ANALISIS DE BORO EN EXTRACTOS DE SUELO Y TEJIDOS VEGETALES POR EL METODO DE LA AZOMETHINA-H

A. Gutiérrez y Mirta Castellanos
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

Palabras claves: *Boro, análisis de tejidos, análisis del suelo, métodos*

ABSTRACT. The optimal conditions for boron analysis were proved in this investigation, using a laboratory synthesized azomethine-H, which was further compared to curcumin procedure, taking into account analytical parameters and practical results from B analysis in soil and crop tissue samples. Some factors contributing to the analytical error of the laboratory were also studied. Due to its greater sensitiveness, accuracy and operational simplicity, this technique is recommended to be applied in soil and crop tissue laboratories as well as in agricultural research institutions.

RESUMEN. En el presente trabajo se comprobaron las condiciones óptimas para el análisis de boro, utilizando azomethina-H sintetizada en el laboratorio. Se comparó este método con el procedimiento de la curcumina, tomando en consideración los parámetros analíticos y los resultados prácticos del análisis de B en muestras de suelo y tejidos vegetales. Además, se estudiaron algunos factores que contribuyen al error analítico de laboratorio. Debido a su mayor sensibilidad, precisión y sencillez operacional, se recomienda la implantación de esta técnica en los laboratorios de suelos y tejidos vegetales, así como en las instituciones de investigaciones agrícolas.

INTRODUCCION

El boro, uno de los siete micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, es generalmente deficiente en los suelos agrícolas (Gupta, 1979). Además, es un nutriente que se caracteriza por presentar estrechos rangos de valores entre los niveles deficientes y tóxicos.

Unido a estos factores, el estudio de la dinámica del B en suelo hace indispensable contar con una técnica de análisis precisa, sensible y de alta productividad (Carpena *et al.*, 1979). Así, Mahler, Hammel y Horder (1985) demostraron la influencia de los métodos de laboreo y rotación de cultivos sobre la disponibilidad de boro de algunos suelos agrícolas, usando el procedimiento de la azomethina-H (Bingham, 1982).

En nuestro país los estudios nutricionales del boro en los diferentes suelos y cultivos han sido escasos. Probablemente una de las razones que influyen en esta realidad reside en la técnica analítica utilizada, que es el mismo método de la curcumina (Dible, Truog y Berger, 1954). Esta técnica es poco sensible y presenta problemas de reproducibilidad, debido al engorroso trabajo analítico que conlleva. Por otro lado, la técnica de la azomethina-H ha extendido su aplicación en los laboratorios agrícolas de diferentes países (Keren y Gast, 1981, León *et al.*, 1983).

Los objetivos del presente trabajo fueron: comparar los métodos de la curcumina y la azomethina-H en sus parámetros analíticos, así como los resultados de B en muestras foliares y extractos de suelo realizados por ambos métodos y analizar algunos factores que afectan la precisión en la determinación de B por esta última técnica.

MATERIALES Y METODOS

Soluciones estándar. La solución de partida de 100 mg/l de B puede obtenerse disolviendo 0.5716 g de ácido bórico en un litro de agua destilada. Se toman de esta solución 0.25; 0.50; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 6.0; y 8.0 ml en volumétricos de 100 ml y se enrasa con solución de HAc al 10 %. Los patrones tendrán concentraciones a las alícuotas utilizadas en mg/l de boro.

Solución buffer enmascarante. Pese 500 g de NH_4Ac y 20 g de Na_2 EDTA y añada agua destilada hasta los 700 ml del beaker, caliente suavemente para acelerar la disolución y filtre si es necesario. Añada 250 ml de HAc y 10 ml de ácido tioglicólico. Compruebe el pH de la solución y fíjelo en 5.1, de ser necesario adicionando HAc. Enrase a 1 l con agua destilada.

Solución de azomethina-H. Pese 4.5 y 5 g de ácido ascórbico. Disuélvalo calentando suavemente en 400 ml de H_2O destilada y enrase a 500 ml. Si se conserva en frío, esta solución es estable por un plazo de 14 días.

Procedimiento analítico. Transfiera 2 ml del patrón, muestra de agua, digestión foliar o extracto de suelo a un tubo de ensayo. Añada 4 ml de solución buffer-enmascarante y 2 ml de azomethina-H. Espere un tiempo mínimo de 45 minutos y lea en el espectrofotómetro a 415 nm en cubetas de vidrio de 1 cm.

Para las mediciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro spekol 11, Carl Zeiss Jena, de lectura digital. En la técnica de la curcumina se empleó la marcha analítica propuesta por Dible, Truog y Berger, 1954.

Con el objetivo de comparar estadísticamente ambos métodos, se escogieron nueve muestras foliares de diferentes cultivos, pesando siete réplicas por muestra y mineralizando por vía seca, según González, Pérez y Chaverri (1956). Al mismo tiempo se escogieron once muestras de diferentes suelos y se les determinó B asimilable por extracción con agua hirviente (Cayton, 1985), con cinco réplicas por muestra. El análisis de Si se hizo gravimétricamente, según Jackson (1970).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se estudió la influencia del pH, la longitud de onda y la concentración de azomethina, encontrándose óptimos los siguientes parámetros: pH = 5.1; longitud de onda = 415 nm; concentración de azomethina = 0.9 g/100 ml, coincidentes los dos primeros con diferentes autores (Lachica, 1976 y Wolf, 1974).

El valor de la concentración de azomethina encontrado coincide con lo informado por Marchal (1977) y se contradice con Bingham (1982), el cual recomienda una concentración de reactivo de 0.45 g/100 ml.

De los elementos presentes en los tejidos vegetales, solo el Cu, Fe y Al interfieren en la determinación de boro. Basson, Böhmer y Staton (1969) señalan como agentes quelatantes eficaces para evitar este efecto al EDTA (0.025 M) y el ácido tioglicólico al 1 % y estos reactivos se utilizan a las concentraciones mencionadas con este objetivo en la solución buffer (España, MINAGRI, 1982). Es probable que estas concentraciones sean inefectivas en el análisis de extractos de suelo, por lo que Bingham (1982) recomienda un engorroso procedimiento de tratamiento del extracto de suelo antes de hacer el análisis de B por este método. Tratando de evitar este proceso se ensayaron diferentes concentraciones de enmascarantes en el buffer.

En la figura 1 aparecen los resultados obtenidos utilizando la solución buffer informada en este trabajo. La combinación de ambos agentes a las concentraciones señaladas es efectiva, para evitar la interferencia del Cu y Al hasta concentraciones individuales de 1 200 ppm. El ligero incremento de la absorbancia con la concentración de Fe puede no tenerse en cuenta, considerando las concentraciones de este elemento presentes en tejidos vegetales y extractos de suelo (Chapman, 1966).

La concentración de agentes enmascarantes utilizada incrementa la tolerancia a las interferencias de estos elementos en el análisis de boro, según lo encontrado por Basson, Böhmer y Staton (1969) de 100 ppm de Cu y Fe y 300 ppm Al.

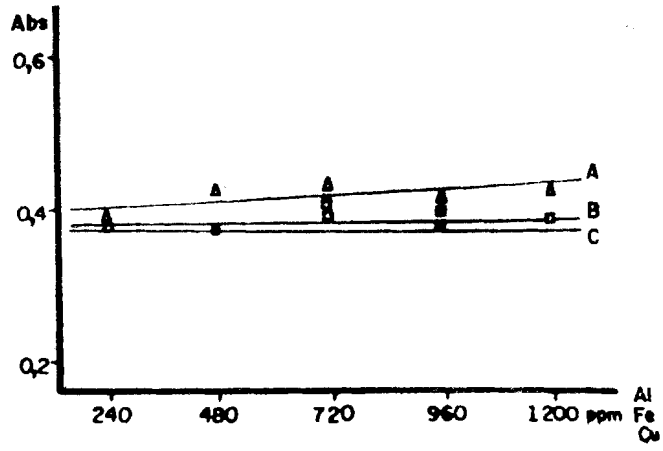


Figura 1. Efecto del NaEDTA (20 g/l) y el ácido tioglicólico (10 g/l) sobre la interferencia del Fe (A), Al (B) y Cu (C). Concentración de boro: 0.5 mg/l; concentración de azomethina: 0.9 g/100 ml; pH = 5.1

En el método de la azomethina-H, la curva de calibración obtenida es una línea recta que parte del origen de coordenadas y presenta desviación negativa de la ley de Beer para las concentraciones mayores de 3 mg/l, coincidiendo con Lachica (1976). El coeficiente de extinción molar obtenido fue 8.4 x 10^3 l/mol.cm, constituyendo una técnica espectrofotométrica de alta sensibilidad, capaz de determinar con precisión concentraciones de boro del orden de los 10 mg/kg de peso seco en tejidos foliares.

Para evaluar la exactitud del método de la azomethina-H, fue analizado el contenido de boro en varias muestras de tejido vegetal y extractos de suelo, mediante la curva de calibración y por adición de estándar del elemento, según aparece reflejado en la tabla I.

La coincidencia en el análisis por ambas metodologías es aceptable, lo cual sugiere que las interferencias tienen poca influencia en el resultado y el recobrado de boro fluctúa entre un 98.8 y 100.2 %.

En la tabla II se muestran los resultados del análisis de B por las dos técnicas, para las muestras foliares de los cultivos señalados y los coeficientes de variación correspondientes, así como la concentración de SiO_2 en por ciento.

Puede observarse una coincidencia aceptable entre los valores obtenidos por cada procedimiento en la misma muestra, pero esta similitud parece disminuir para pequeñas concentraciones de boro en el tejido vegetal y en igual sentido parece aumentar el coeficiente de variación.

Tabla I. Exactitud del método de azomethina-H para el análisis de boro en suelos y muestras vegetales

Tipo de muestra	Adición (ppm)	Concentración de boro, curva de calibración (ppm)	Concentración de boro, curva de adición estándar (ppm)	Por ciento de recobrado
Muestra foliar de café	0	71.90	75.30	–
	1	200.00	197.60	98.80
Muestra foliar de plátano	0	18.35	18.00	–
	1	200.00	199.83	99.91
Suelos pardos con carbonatos	0	0.692	0.683	–
	1	16.00	15.97	99.80
Suelo Ferralítico Rojo compactado	0	0.90	0.82	–
	1	16.00	16.03	100.20
Suelo Ferralítico Rojo de montaña (Topes)	0	1.27	1.35	–
	1	16.00	15.97	99.80

Tabla II. Comparación entre las técnicas para el análisis foliar de boro

Muestras foliares	Azomethina - H		Curcumina		Conc. SiO_2 (%)
	B (ppm)	C.V. (%)	B (ppm)	C.V. (%)	
Café	129.4	1.97	115.7	2.3	0.50
Cítricos	63.5	3.63	59.2	4.1	0.48
Caña (TVD)	25.1	5.20	11.3	26.8	1.03
Frijol	48.9	1.68	40.3	4.3	1.68
Arroz (vaina)	32.7	5.30	12.2	9.4	5.20
Plátano	35.9	3.06	26.2	3.7	1.92
Tabaco	50.4	3.40	41.2	3.8	0.41
Arroz (limbo)	23.6	12.80	10.2	18.2	7.00
Guayaba	87.4	2.00	92.4	4.0	0.46

Dada la importancia del error analítico en la determinación de concentraciones foliares de nutrientes, se procedió al ajuste de estos datos para cada método, utilizando programas de mínimos cuadrados de uso general. Las ecuaciones de mejor correlación obtenidas se muestran en la figura 2. Según los valores de r obtenidos, las curvas reflejan una dependencia estadísticamente confiable, para sugerir algunas conclusiones fundamentales.

En el análisis de boro por el método de la azomethina-H, el coeficiente de variación fluctúa entre el 5 y el 2 % (Figura 2), en el rango de concentraciones analizado y tiende a disminuir al aumentar la concentración foliar del elemento. Teniendo en cuenta los errores en el muestreo de campo (Carvajal, 1984 y Le Vu Van, 1987), el método es confiable para el diagnóstico de estados de deficiencia óptimos y tóxicos en el análisis foliar.

En el análisis de B por el procedimiento de la curcumina, el error de laboratorio es pequeño para concentraciones mayores de 40 ppm. Sin embargo, a medida que disminuye la concentración de B por debajo de este límite, el error analítico aumenta rápidamente, llegando a valores superiores al 20 %.

Es decir, aún cuando el método de la curcumina es útil para el diagnóstico de la toxicidad de boro (Cayton, 1985), no es confiable para el diagnóstico de la deficiencia de boro en la mayoría de los cultivos fundamentales de nuestro país (Chapman, 1966 y Gascho, 1979).

De los datos expuestos en la tabla III, se hace evidente que la técnica de la azomethina-H es más sensible y precisa, además de poseer un rango de utilidad más extenso, cubriendo los límites nutricionales mínimos y máximos de la mayoría de los cultivos (Chapman, 1966).

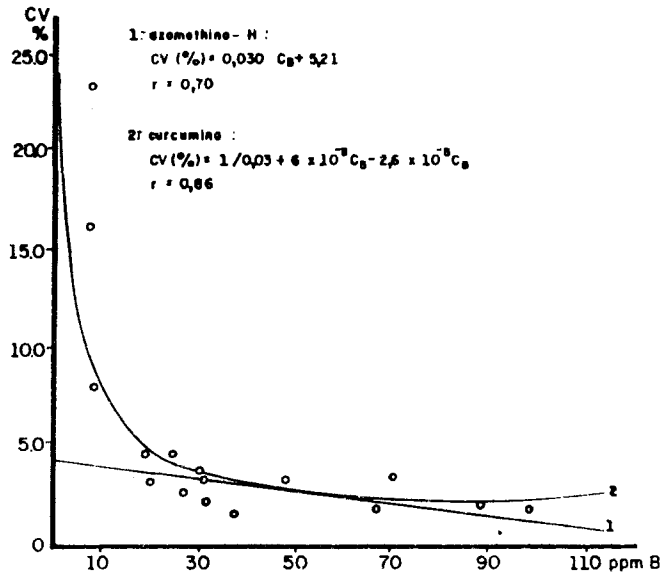


Figura 2. Dependencia entre el coeficiente de variación y la concentración foliar de boro para cada método

Además, la productividad en el análisis masivo es de tres a cuatro veces mayor y esta es posible incrementarla con el uso de autoanalizadores (Marchal, 1977), lo que no es posible en el caso de la curcumina.

Tabla III. Principales parámetros analíticos de los métodos en estudio

Parámetro	Azomethina	Curcumina
Sensibilidad	8.377 x10^3 l/mol cm	1.893 x10^3 l/mol cm
Coef. determ.	0.9995	0.98
Precisión	1- 5 %	3-25.7 %
Rango útil en análisis foliar	5-600 ppm	10-80 ppm/21/
Cumplimiento Ley Beer	0-3 ppm	0-4 ppm/21/

En la figura 3 se muestra la relación entre el error analítico de laboratorio y la concentración de sílice. La ecuación parabólica encontrada muestra un coeficiente de correlación altamente significativo, lo que implica que la concentración de este elemento en la muestra vegetal influye decisivamente en el error analítico.

Probablemente esto se deba a dos factores interrelacionados: adsorción de boro en las partículas coloidales de dióxido de silicio y combustión incompleta del tejido vegetal obstaculizada por el alto contenido de sílice.

Este último factor no es eliminable por calcinación a mayores temperaturas, pues podrían producirse pérdidas de B por volatilización (Mortverdt, Giordano y Lindsay, 1972) y la digestión húmeda, que produce mayores recobrados para la mayoría de los microelementos, en muestras vegetales con alto contenido de sílice (Basson y Böhmer, 1972), es inaplicable para el boro, el cual se volatiliza fácilmente por calentamiento en solución acuosa ácida (Yamada y Hattori, 1986).

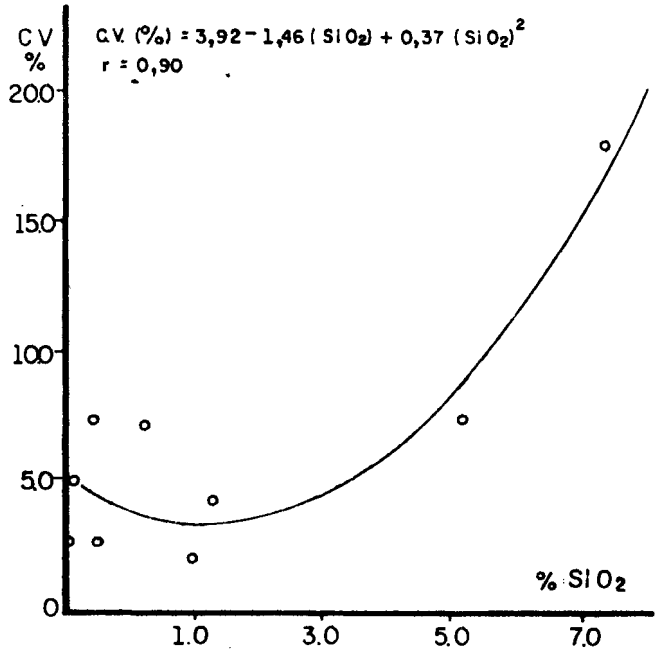


Figura 3. Dependencia entre el coeficiente de variación y la concentración de sílice en el tejido vegetal

Tabla IV. Resultados del análisis de boro asimilable en suelos por los métodos bajo estudio

Suelos		B Asimilable			
		Azomethina		Curcumina	
		$\bar{x}$ (ppm)	C.V.	$\bar{x}$ (ppm)	C.V.
Ferralítico Rojo de montaña	1	2.79	2.88	2.18	05.89
Oscuro Plástico gleyzado	2	2.63	5.40	1.11	13.54
Húmico carbonático	3	1.48	1.77	1.07	11.22
Ferralítico Amarillento lixiviado	4	1.06	4.97	1.02	17.32
Amarillo Rojizo lixiviado	5	2.40	3.73	2.64	3.74
Ferralítico Rojo compactado desaturado	6	1.74	6.48	1.22	9.54
Amarillo Rojizo lixiviado	7	1.70	8.22	1.40	9.37
Ferralítico Amarillento lixiviado	8	1.64	7.88	1.39	29.59
Ferralítico Amarillento concrecionario	9	1.87	8.54	1.15	12.77
Ferralítico Amarillento concrecionario	10	1.49	8.98	0.42	28.60
Ferralítico Rojo compactado	11	2.93	3.49	3.53	8.43

Se debe señalar que, aunque el contenido de sílice es un factor importante para el análisis foliar de B, las muestras vegetales que presentan contenidos de sílice inferiores al 5.5 %, no deben presentar errores analíticos fuera del rango encontrado para la azomethina-H. El valor del coeficiente de correlación sugiere la influencia de otros factores no estudiados en el presente trabajo.

En la tabla IV aparecen los resultados del análisis de B asimilable en algunos suelos cubanos. Los tenores del elemento extractables con agua hirviente muestran valores aceptablemente coincidentes en la mayoría de los suelos.

La diferencia en los resultados de la técnica de la curcumina para algunos suelos pudiera deberse a un contenido de nitratos superior a 20 ppm en ellos, lo que interfiere negativamente la determinación de B por este procedimiento (Dible, Truog y Berger, 1954).

El coeficiente de variación fluctúa entre el 1 y el 8 %, coincidente con los encontrados por el método de la azomethina en suelos de la URSS (Zamoxvalov y Zhalekova, 1978).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, el procedimiento de la curcumina debe ser poco confiable en el diagnóstico de niveles deficientes de boro en la mayoría de los cultivos.

Probablemente el constituyente foliar que más influya sobre la precisión del análisis químico es el silicio, lo cual debe estar condicionado por el método de mineralización usado para el análisis de boro en muestras vegetales, sin embargo, para concentraciones del 5.5 % de este elemento o menores, el error analítico no sobrepasa el límite informado.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo la técnica de la azomethina-H ha mostrado características óptimas para ser utilizada en el análisis de boro en suelos y tejidos vegetales de nuestro país, siendo útil al mismo tiempo para el diagnóstico de cualquier estado nutricional de este elemento en nuestros cultivos.

RECOMENDACIONES

Sustituir en las Estaciones Experimentales e Institutos de Investigación de Temáticas Agrícolas de nuestro país, el procedimiento de la curcumina por el propuesto en este trabajo. Probablemente la extensión de esta técnica contribuya a incrementar los estudios nutricionales del boro en nuestros suelos y cultivos.

BIBLIOGRAFIA

Bases para el diagnóstico del exceso de boro en limonero. / A. León.../*et al.*/.— **En**: Anales de Edafología y Agrobiología, 1986.— t. 42; p. 807-817.

Basson, W. D.; R. G. Böhmer y D. A. Staton. An automated procedure for the determination of boron in plant tissue. **Analyst** (Tokio)94:1135-1141, 1969.

Basson, W. D. y R. G. Böhmer. An investigation into more rapid procedures for preparing leaf tissue samples for analysis. **Analyst** (Tokio)97:432-489, 1972.

Bingham, F. T. Methods of soil analysis.— Part. 2. **Agronomy Monograph** :9, 1982.

Carpena, D. [*et al.*]. Dinámica del boro en suelos calizos con alto contenido de arcilla. **Agrochimica** (Pisa)23(1), 1979.

Carvajal, J. F. Cafeto: cultivo y fertilización. / J. F. Carvajal.— 2, ed.— Berna : Instituto Internacional de la Potasa, 1984.— 254 p.

Cayton, M. T. Boron toxicity in rice. **IRRI research paper series** (Manila) abril, 1985.

Chapman, H. D. Diagnosis criteria for plant and soil. / H. D. Chapman.— Londres : University of London Press, 1966.

Dible, W. T.; E. Truog y K. C. Berger. Boron determination in soil and plant. Simplified curcumin procedure. **Analytical Chemistry** (Washington)26(2), 1954.

España. Ministerio de la Agricultura. Métodos oficiales de análisis. Aguas. / Ministerio de la Agricultura.— Madrid, 1982.

Gasho, G. J. Tissue testing of Florida sugarcane. **The Sugar Journal** (New Orleans), 1979.

González, C.; V. M. Pérez y G. R. Chaverri. Algunos aspectos de abonamiento del cafeto con boro y calcio en las condiciones de la meseta central de Costa Rica. **Información Técnica** (San José)1, 1956.

Gupta, U. C. Boron nutrition of crops. **Advances in Agronomy** (Londres)32, 1979.

Jackson, M. L. Análisis químico de suelos. / M. L. Jackson.— La Habana : Instituto del Libro, 1970.

Keren, R. y R. G. Gast. Effects of wetting and drying, an exchangeable cation of boron adsorption and release by montmorillonite. **Soil Sci. Soc. Am. J.** (Londres)45:. 478-482, 1981

Lachica, M. Estudio sobre la determinación de boro en plantas con azomethina-H. / M. Lachica.— **En**: 4th. International College Contribution of Plant Nutrition, 1976.— t. 2, p. 53-61.

Le Vu Van. Tamaño óptimo de muestra foliar para representar el estado nutricional del naranjo Valencia Late.— Trabajo de Diploma; 1987.

Mahler, R. L.; J. E. Hammel y R. W. Horder. The influence of crop rotation and tillage method on the distribution of extractable boron in northern Idaho soils. **Soil Sci.** (New Brunswick)139(1):67-73, 1985.

Marchal, J. Dossage de Bore a L'azomethina-H dans les tissues vegetaux Methode utilisee a L' IRFA et aux laboratoires du Gerdat IRFA. / J. Marchal.— Montpellier, 1977.

Mortverdt, J. Micronutrients in Agriculture. / J. J. Mortverdt, R. M. Giordano, W. L. Lindsay, 1972.

Yamada H. y T. Hattori. Determination of total boron in soil by the curcumin-acetic acid method after extraction with 2 ethyl-1,3 hexanediol. **J. Soil Sci. and Plant Nutr.** (Londres)32(1):135-139, 1986.

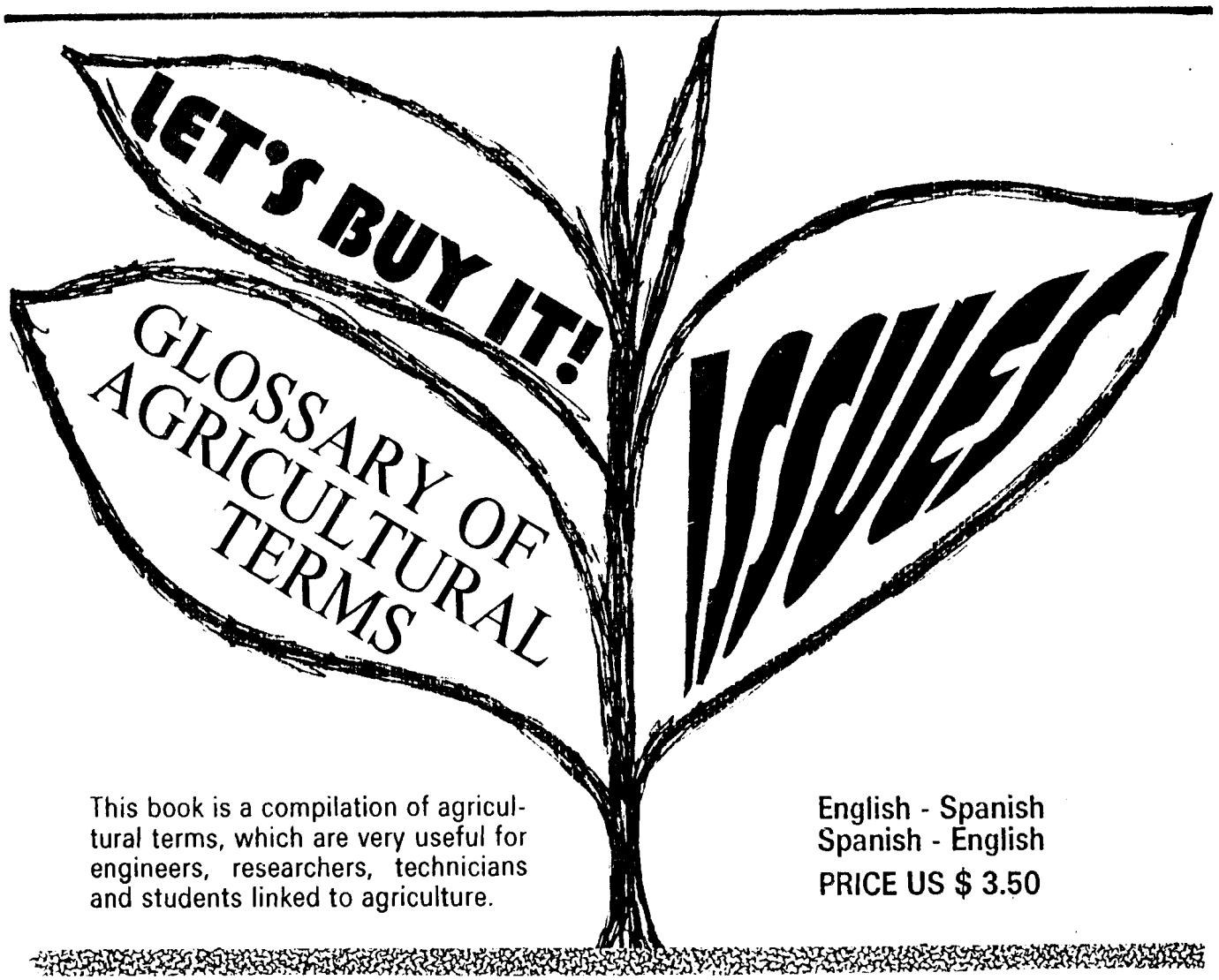
Zamoxvalov, C. G. y N. A. Zhalekova. Determinación espectofotométrica del B asimilable en suelos por el método de la azomethina-H. Servicio Agroquímica ZINAO, Moscú, 1978.

ANEXO
SINTESIS DE AZOMETHINA-H

Técnica Operatoria. A 900 ml de agua destilada, añada 20 g de sal monosódica del ácido 8 amino 1 naftol 3.6 disulfónico (H-acid) y homogenice. Neutralice hasta pH = 7 con solución de NaOH al 10 % agitando continuamente. A este pH la solución tendrá un color carmelita oscuro, será transparente y todo el sólido debe estar disuelto. Luego, acidifique hasta pH = 1.5 con solución de HCl al 20 %.

Transfiera el contenido a un erlenmeyer de 1l, coloque en baño de María a 45-50 °C y agite enérgicamente con ayuda de un agitador eléctrico de varilla.

Añada 20 ml de aldehido salicílico y continúe la agitación por una hora. Deje reposar un mínimo de 12 horas. Decante la solución marrón sobrenadante y filtre al vacío a través de un filtro de vidrio número 3 ó 4. Lave el precipitado con 5-6 porciones de 100 ml de etanol (mínimo 96 %), removiendo el sólido luego de cada adición de etanol. Filtre a sequedad. Ponga a secar en estufa a 105 °C por tres horas, pulverice el residuo, transfiéralo a un pomo seco y consérvelo en desecadora. La azomethina-H resultante debe tener un color naranja. El rendimiento práctico de la síntesis oscila entre 18-21 g.

Cálculos. Usando la relación estándar-buffer-azomethina mencionada anteriormente, los patrones de curva de calibración tendrán una concentración de 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0 y 2.0 mg/l. Calcule la pendiente de la curva de calibración e interpole la absorbancia de la muestra usando la ley de Lambert-Beer. Multiplique ese valor por la dilución correspondiente (4) y por la relación V digestión/masa de muestra foliar (g) o V de extrayente/masa de suelo, según desee sus resultados en ppm de materia seca o mg/kg de suelo.

Recibido: 26 de enero de 1990
Aceptado: 16 de febrero de 1990