REVISION DE UN METODO NO REDUCTIVO PARA LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FOSFORO EXTRACTABLE EN SUELOS

Peter E. Daniel y Liliana Marban de Ravera

Investigador y Profesional del CONICET, respectivamente.
Laboratorio de Química Geológica y Edafológica (LAQUIGE). J. R. de Velasco 847, (1414) - Capital Federal, Argentina

RESUMEN

Se efectuó una revisión crítica de un método espectrofotométrico no reductivo para la determinación de fósforo en extractos de suelo. Dicho método tiene la ventaja de utilizar el agregado de un solo reactivo, y está basado en la formación de una sal insoluble entre el 12-molibdofosfato y el cristalvioleta. Esta sal se mantiene como precipitado microcristalino en suspensión por un agente tensioactivo, el alcohol polivinílico, permitiendo así la lectura en espectrofotómetro durante un intervalo prolongado.

Palabras Clave: Determinación espectrofotométrica, fósforo extractable en suelos, método no reductivo.

REVISAL OF A NON-REDUCTIVE METHOD FOR SPECTROPHOMETRIC DETERMINATION OF EXTRACTABLE PHOSPHORUS IN SOILS

ABSTRACT

A spectrophotometric, non-reductive method was revised for the determination of phosphorus in soil extracts. This method has the advantage of the addition of only one reagent and is based in the formation of an insoluble salt with 12- molibdophosphate and cristalviolet. This salt is maintained in suspensions as microcristaline precipitate, using polyvynil alcohol, allowing in this way the spectrophotometric determination during a relatively long period of time.

Key Words: Spectrophotometric determination, extractable soil phosphorus, non-reductive method.

INTRODUCCION

La mayoría de los métodos espectrofotométricos utilizados para la determinación de fósforo en extractos de suelos y otras soluciones, utilizan la reducción del 12-molibdofosfato, en medio ácido, a azul de molibdeno (Jackson, 1964; Hesse, 1971; Black, 1965). Estos métodos implican generalmente un gran número de manipulaciones, y en algunos casos un tiempo limitado para la lectura. Con el próposito de hallar un método que reúna la simplicidad del agregado de un solo reactivo con una mayor estabilidad de color, se revisó una técnica basada en la formación de una sal insoluble azul-violácea, entre el cristalvioleta y 12-molibdofosfato. El precipitado así formado es mantenido en forma coloidal por un agente tensioactivo (Burns y McAlister, 1981). El exceso del colorante se protoniza en medio ácido, formando un catión de carga doble de color verde.

MATERIALES Y METODOS

Equipos utilizados:

Para las determinaciones espectrofotométricas se

utilizó un ZEISS PMQ3, con una celda de flujo contínuo de 1 cm de camino óptimo.

Las incubaciones se realizaron en un baño de agua termostatizado.

Reactivos:

1) Solución molibdato/cristalvioleta

Sol. A: Cristalvioleta 5.10^{-4} M en alcohol polivinílico: 2.04 g de cristalvioleta se agregan de a poco sobre aprox. 320 ml de H_2O dest. en agitación contínua, hasta total disolución. Aparte se prepara una solución de alcohol polivinílico al 1 por ciento (p/v), calentando y agitando hasta total transparencia. De esta solución se agregan 560 ml a la solución cristalvioleta llevándose a 1.000 ml con H_2O dest.

Sol. B: Molibdato de sodio 0,1M en H_2SO_4 20 por ciento (p/v): 24,2 g de $MoO_4Na_2 . 2H_2O$ se disuelven en 500 ml de H_2O dest., se le agregan 112 ml de H_2SO_4 concentrado (δ = 1,84) en baño de agua fría, enrasando a 1.000 mililitros.

Solución de trabajo: Se mezclan una parte de la solución cristalvioleta/alcohol PV, con cuatro partes de molibdato de sodio ácido. Se agita y se espera una hora para su uso.

2) Soluciones patrón de fósforo

Solución madre: (100 ppm P): Se disuelven 0,4393 g de $PO_4 H_2K$ en H_2O dest. y se llevan a 1.000 ml. Guardar en congelador en recipiente de plástico (−10°C). Para el uso diario se diluye la solución madre adecuadamente con las respectivas soluciones extractoras (de esta manera se incluye en la curva la misma matriz que en las muestras), hasta obtener 1, 2 y 3 ppm de fósforo.

Suelos utilizados

Las muestras que se utilizaron durante los ensayos, pertenecen a suelos de la región pampeana, incluyendo Hapludoles típicos y petrocálcicos, Argiudoles típicos y Natralboles. Los suelos fueron secados a 40°C con aire forzado y molidos hasta pasar por un tamiz de malla Nº 30 (0,59 mm).

Métodos de extracción:

1) Bray Nº1 (Bray y Kurtz, 1945): Solución extractora: 0,03N FNH_4 + 0,025N HCl, relación suelo: solución = 1: 7, agitar cinco minutos y luego centrifugar.
2) Olsen (Olsen y col., 1954): Solución extractora: CO_3 HNa 0,5 M pH = 8,5. Relación suelo/solución 1: 20, más 100 mg de carbón activado Darco G 60 por cada 20 ml de solución extractora. Agitar treinta minutos, centrifugar y filtrar a través de papel SS banda azul o equivalente.
3) Truog (Jackson, 1964): Solución extractora: H_2SO_4 0,002 N, pH = 3. Relación suelo/extractante 1: 200. Agitar rotativamente durante treinta minutos y centrifugar.
4) Carolina del Norte (Nelson y col., 1953): Solución extractora: 0,7 ml de H_2 SO_4 conc. + 4,1 ml HCl conc. se llevan a 1.000 ml con H_2O destilada. Relación suelo/extractante 1:4, más 200 mg de carbón activado Darco G 60 por cada 20 ml de solución extractora. Agitar cinco minutos, centrifugar y filtrar.

Métodos colorimétricos

a) Con cristalvioleta: se toman 0,5 ml de alícuota en tubo de ensayo (1 ml para el método Truog), se agregan 3 ml del reactivo mezcla (solución de trabajo), se agita y se incuba a 50°C durante 15 minutos. Se deja enfriar en heladera y se lee a 560 nm.

b) Por azul de molibdeno reducido con cloruro estannoso (Jackson 1964): Para Bray 1, Olsen y Carolina del Norte se utiliza el complejo cloromolíbdico, y para Truog el sulfomolíbdico.

RESULTADOS Y DISCUSION

La formación del precipitado azul-violáceo en la reacción entre el 12-molibdofosfato y el cristalvioleta depende de una serie de factores tales como: tiempo temperatura de incubacion, concentración del ácido sulfurico en el reactivo, efecto de dilución e interferencias químicas. Con el objeto de analizar críticamente las condiciones de trabajo definidas por Burns y McAlister (1981), se investigó cada una de las variables.

a) Efecto de la concentración de ácido sulfúrico en el reactivo:

Se probaron concentraciones de ácido sulfúrico entre 10 y 24 por ciento (p/v). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se vió que las concentraciones de ácido por debajo del 16 por ciento producen un precipitado de grano muy grueso, que sedimenta rápidamente. En los casos de 16 y 18 por ciento de ácido sulfúrico también aumenta el tamaño del grano, sin llegar a precipitar.

TABLA 1: Efecto de la concentración de ácido sulfúrico en el reactivo sobre el desarrollo del color.

H_2SO_4 % (p/v)	Absorbancia (2 µgP)
24	0,553
22	0,709
20	0,741
18	0,812 *
16	0,847 *
14	**
10	**

* Se observó un aumento en el tamaño del precipitado formado.
** El precipitado floculó, impidiendo la lectura.

Para estudiar el efecto combinado entre la acidez del reactivo y la de las muestras, se ensayaron tres concentraciones de sulfúrico en el reactivo, contra un rango de acidez en la alícuota, entre H_2SO_4 1N y HONa 1N (Fig. 1).

Los resultados obtenidos con el reactivo que contiene un 24 por ciento de ácido sulfúrico se ven más afectados por la acidez de la muestra que en los dos casos restantes. Por razones de economía de ácido sulfúrico se eligió para futuros trabajos la concentración de 20 por ciento del mismo. En el gráfico también se demuestra que el método puese ser utilizado para un amplio rango de acidez en la muestra.

b) Efecto del tiempo y de la temperatura de incubación

Aunque Burns y McAlister, 1981, usan una incubación de 20 minutos a 35°C, se ha encontrado más sensibilidad y más estabilidad del color con una incubación a 50°C, pudiéndose reducir el tiempo a 15 minutos. Los distintos ensayos al respecto se muestran en las Tablas 2 y 3.

En la Tabla 4 se ve la estabilidad del color, en las condiciones anteriormente fijadas, hasta tres horas después del desarrollo del color.

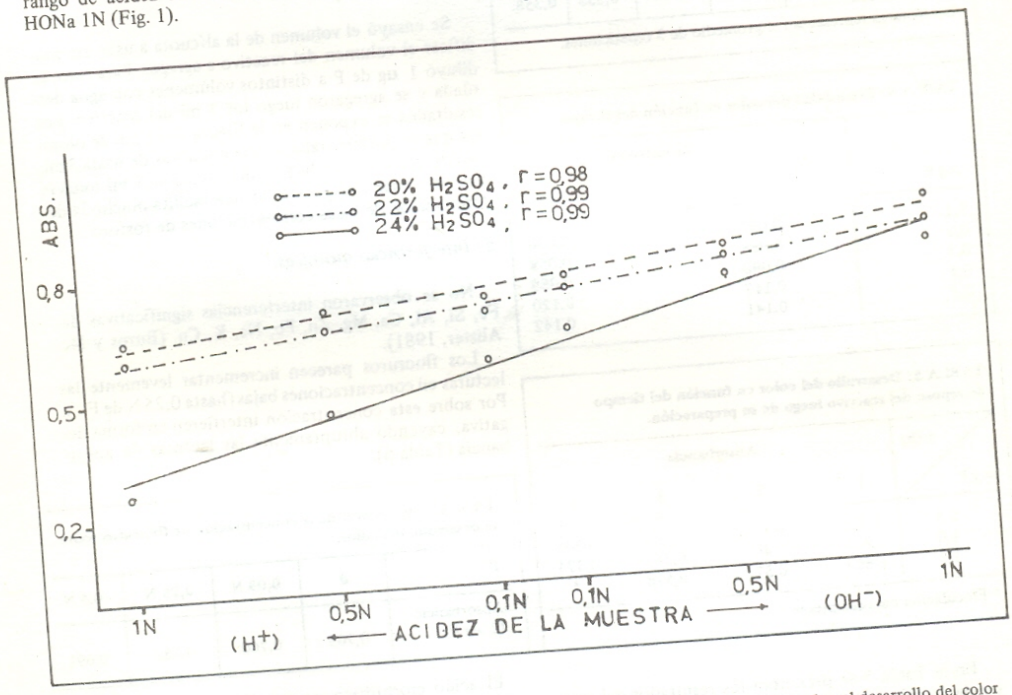

Fig. 1: Influencia de la acidez de la muestra y de la concentración de ácido sulfúrico en el reactivo sobre el desarrollo del color (2 µg P).

TABLA 2: Influencia de la temperatura de incubación sobre la estabilidad del color luego de la incubación.

t (Min) * / µgP	20 Min a 35°C		20 Min a 50°C		
	Absorbancia		Absorbancia		
	0	30	0	30	60
0,5	0,016	0,023	0,113	0,108	0,109
1	0,036	0,043	0,222	0,225	0,214
2	0,066	0,087	0,484	0,471	0,469
3	0,119	0,151	0,694	0,675	0,683
5	0,177	0,233	1,109	1,008	0,965

* Tiempo luego de la incubación.

TABLA 3: Influencia del tiempo de incubación a 50°C sobre el desarrollo del color.

T (Min)	10	20	30	40	60
Absorbancia (2 µg P)	0,350	0,348	0,352	0,355	0,358

Las lecturas representan el promedio de 3 repeticiones.

TABLA 4: Estabilidad del color en función del tiempo.

µg P	Absorbancia 0 h	Absorbancia 3 h
0,1	0,029	0,030
0,2	0,058	0,059
0,3	0,090	0,089
0,4	0,117	0,120
0,5	0,141	0,142

TABLA 5: Desarrollo del color en función del tiempo de reposo del reactivo luego de su preparación.

t (h) / µ g P	Absorbancia 1	2	3	5
0,5	0,221	0,199	0,206	0,206
1,0	0,416	0,405	0,385	0,374
1,5	0,603	0,577	0,576	*

* Floculación del precipitado.

En la Tabla 5 se presentan los resultados del ensayo de la vida útil del reactivo, una vez mezclado. Se desprende de los datos obtenidos, que la mezcla no debe ser preparada con más de tres horas de anticipación, luego de los cuales empieza a modificarse la estructura del precipitado micro-cristalino formado.

c) Efecto de dilución.

Se ensayó el volumen de la alícuota a usar, sin modificar el volumen del reactivo a agregar. Para esto, se diluyó 1 µg de P a distintos volúmenes con agua destilada y se agregaron luego los 3 ml del reactivo. Los resultados se exponen en la Figura 2. Se puede observar que es posible trabajar con alícuotas de hasta 3 ml, sin afectar la sensibilidad. Inclusive con 5 ml todavía hay una buena respuesta, lo que facilita mucho la determinación de bajas concentraciones de fósforo.

d) Interferencias químicas:

No se observaron interferencias significativas de: Fe, Si, Al, Ca, Mg, Zn, Pb, Na, K, Cu. (Burns y McAlister, 1981).

Los fluoruros parecen incrementar levemente las lecturas en concentraciones bajas (hasta 0,25 N de F^-). Por sobre esta concentración interfieren en forma negativa, cayendo abruptamente las lecturas de absorbancia (Tabla 6).

TABLA 6: Influencia de la concentración de fluoruros sobre el desarrollo del color.

F^-	0	0,03 N	0,25 N	0,5 N
Absorbancia (2 µg P)	0,709	0,760	0,785	0,091

El ácido clorhídrico no interfiere hasta una concentración de 0,5 N. Por sobre este valor y con 1N la sensibilidad baja aproximadamente un 15 por ciento (Tabla 7).

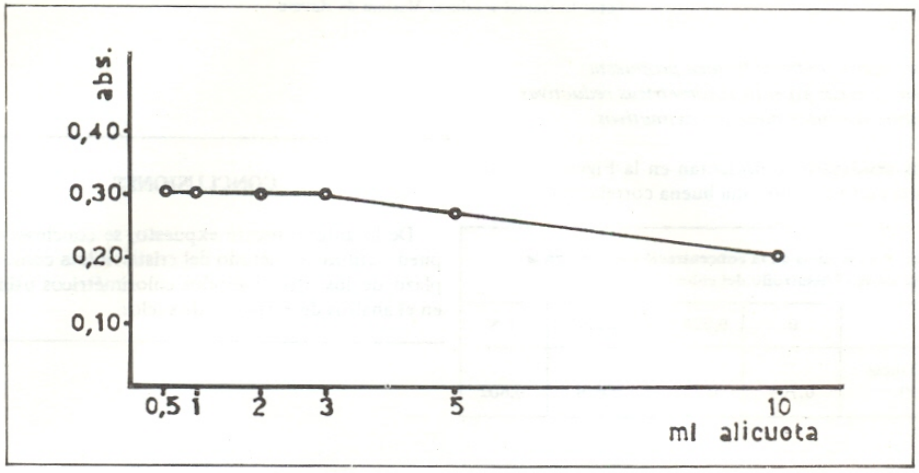

Fig. 2: Efecto del volumen de la alícuota sobre el desarrollo del color (1 µg P).

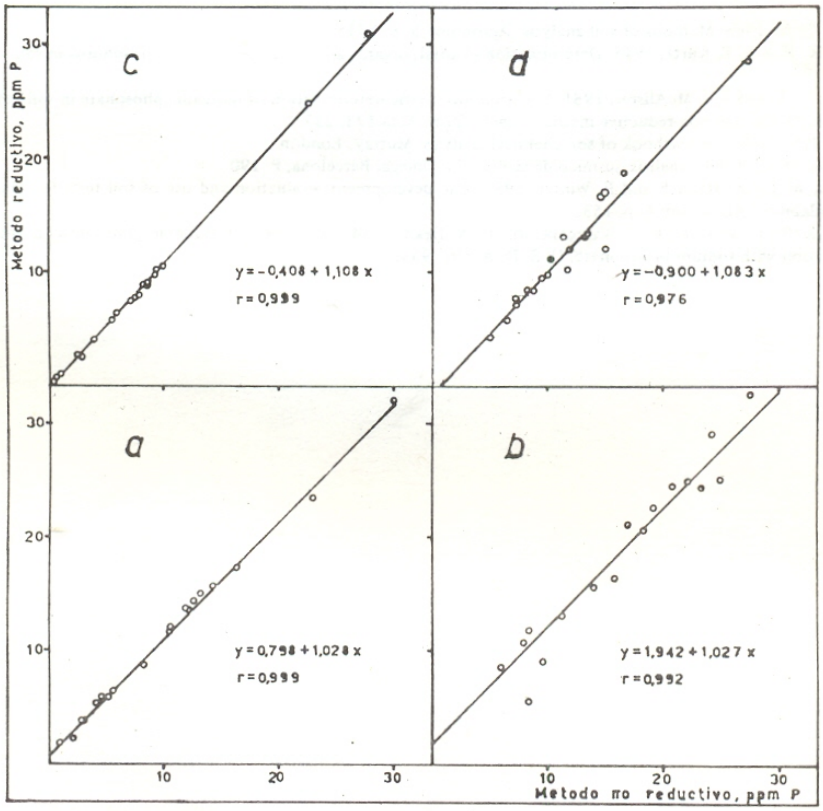

Fig. 3: Correlación entre el método propuesto y el método reductivo para fósforo extractable en suelos. a) Kurtz y Bray Nº 1, b) Truog, c) Carolina del Norte, d) Olsen.

e) Correlación entre la técnica propuesta y las técnicas espectrofotométricas reductivas, usando distintos métodos extractivos:

Los resultados se presentan en la Figura 3, observándose en todos ellos una buena correlación.

TABLA 7: Influencia de la concentración de HCl en la muestra sobre el desarrollo del color.

ClH	0	0,025 N	0,5 N	1 N
Absorbancia (2 µg P)	0,709	0,729	0,676	0,602

CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto, se concluye que se puede utilizar el método del cristalvioleta como reemplazo de los otros métodos colorimétricos utilizados en el análisis de extractos de suelos.

REFERENCIAS

Black, C. A., 1965. Methods of soil analysis. Agronomy 9, p. 1035.

Bray, R. H. y L. T. Kurtz, 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. 59, 39.

Burns, D. T. and J. J. McAlister, 1981. Spectrophotometric determination of inorganic phosphate in soil extracts by a single solution non-reductive method. Anal. Chim. Acta 128, 257.

Hesse, P. R., 1971. A textbook of soil chemical analysis. Murray, London.

Jackson, M. L., 1964. Análisis químico de suelos. Ed. Omega, Barcelona, P. 190.

Nelson, W. L.; A. Mehlich and E. Winter, 1953. The development, evaluation and use of soil tests for phosphorus availability. Agronomy 4, p. 153.

Olsen, S. R.; C. V. Cole, F. S. Watanabe and L. A. Dean, 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U. S. D. A. circ. 939.