

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SEDE DE OCCIDENTE

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN LABORATORISTA QUÍMICO

**Desarrollo de una metodología para la determinación de azufre en
fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión
atómica con plasma acoplado inductivamente.**

Nancy Fabiola Rojas Ballesteros

2020

Hoja de aprobación del Trabajo Final de Graduación

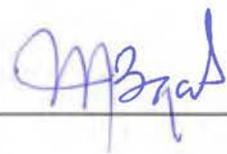
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajos Finales de Graduación del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado académico de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Desarrollo de una metodología para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

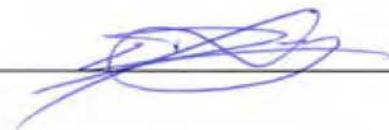
M.Sc. John Diego Bolaños Alfaro
Presidente del Tribunal



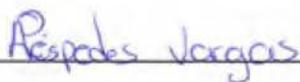
Lic. Marvin Bogantes Jiménez
Miembro del Tribunal



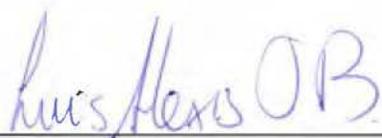
MII. Denis Víquez Murillo
Director de tesis



Lic. Patricia Céspedes Vargas
Lectora



M.Sc. Luis Alexis Jiménez Barboza
Lector





Nancy Fabiola Rojas Ballester
Sustentante

Dedicatoria

A Dios y a la divina misericordia, por darme la fuerza y sabiduría para continuar en este proceso y no rendirme a pesar de las adversidades.

A mi papá y abuelo Juan Balletero, quien falleció el 17 de abril del 2020. Por marcar mi vida con el amor más sincero. Por ser el ángel que Dios me regaló desde niña para mostrarme que no estaba sola. Porque con sus consejos y ejemplo me enseñó a disfrutar la vida y a ser feliz sin importar si se tiene mucho o poco. Por ser ese ángel que aún me sigue demostrando lo mucho que me ama, y por enseñarme que la muerte no tiene poder sobre el amor.

Agradecimientos

A mis papás, por todo el esfuerzo y los sacrificios que con amor han hecho a lo largo de los años por mis hermanas y por mí. Por inculcarme los valores de la responsabilidad, la humildad y el esfuerzo; por enseñarme a trabajar por mis sueños y metas y por apoyarme en todo momento.

A mis hermanas porque me inspiran a ser una mejor persona y un ejemplo por seguir para ellas.

A mi tutor Denis Víquez y a mis lectores Patricia Céspedes y Luis Jiménez; por brindarme su valioso tiempo, su guía y su conocimiento. Gracias por aventurarse a ser parte de este proceso conmigo.

A todos mis estimados compañeros del laboratorio, por toda la ayuda y el apoyo brindado. Gracias por estar siempre para escucharme, aconsejarme y alentarme a seguir adelante.

A esas personas cercanas quienes formaron parte de todo este proceso, gracias por estar siempre a mi lado brindándome todo su amor y apoyo.

A mis profesores, gracias por estos años de aprendizaje.

Hoja de aprobación del Trabajo Final de Graduación.....	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de acrónimos	xii
Resumen.....	xiv

Contenido	pág.
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	5
1.3 Objetivo general y objetivos específicos	8
1.3.1 Objetivo General.....	8
1.3.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Marco Teórico.....	9
2.1 Generalidades de los fertilizantes.....	9
2.2 Elementos esenciales para las plantas.....	10
2.3 Azufre.....	10
2.4 El ciclo biogeoquímico del azufre.....	11
2.5 Fuentes de azufre en fertilizantes.....	12
2.6 Técnicas de análisis de azufre en fertilizantes.....	13
2.7 Fundamento de la espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).....	14
2.7.1. Sistema de introducción de la muestra.....	14
2.7.2. La fuente del plasma.....	15
2.7.3. Atomización e ionización de los analitos.....	17

2.7.4. Configuración de vista del plasma	18
2.7.5. Sistema óptico.	20
2.7.6. Detección de la radiación emitida.	20
2.7.7. Ventajas del ICP-OES.	21
2.8 Validación.	22
Capítulo 3. Marco Metodológico.....	25
3.1 Lugar de investigación.	25
3.2 Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre por ICP-OES.....	25
3.2.1 Preparación de la muestra enriquecida para el desarrollo de la metodología de análisis de azufre por ICP-OES.	25
3.2.2 Parámetros instrumentales de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.....	27
3.3 Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	28
3.4 Análisis del contenido de azufre en muestras de fertilizantes inorgánicos.	29
3.5 Comparación de los resultados de azufre obtenidos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.....	31
Capítulo 4. Resultados.	32
4.1 Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	32
4.2 Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	36
4.2.1 Linealidad e intervalo de trabajo.	36
4.2.2 Selectividad.	37
4.2.3 Límite de detección y cuantificación.	38
4.2.4 Veracidad.....	39
4.2.5 Repetibilidad.....	39
4.2.6 Precisión intermedia.	40
4.2.7 Robustez.....	40
4.2.8 Incertidumbre.....	42

4.3	Análisis del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.	45
Capítulo 5. Discusión de resultados.		50
5.1	Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	50
5.2	Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	53
5.3	Análisis del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.	55
Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones.....		59
6.1	Conclusiones.	59
6.2	Recomendaciones	60
Referencias bibliográficas.		61
Anexo A. Certificado análisis del Sulfato de Amonio ((NH₄)₂ SO₄).		70
Anexo B. Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES 		72
	Evaluación de la linealidad e intervalo de trabajo.....	72
	Evaluación de la Selectividad.....	72
	Evaluación del límite de detección y cuantificación.....	74
	Evaluación de la Veracidad.....	74
	Evaluación de la Precisión.....	75
	Repetibilidad.....	75
	Precisión intermedia	76
	Evaluación de la Robustez	77
Anexo C. Muestra de cálculo de la incertidumbre para la metodología de análisis de azufre en fertilizantes por ICP-OES.....		79
	Incertidumbre de la concentración emitida por el equipo (μCe).	79
	Incertidumbre asociada a la curva de calibración (μCc).	79
	Incertidumbre asociada al estándar de azufre (μest).	81
	Incertidumbre asociada al factor de dilución.	84
	Incertidumbre asociada al balón aforado.....	84
	Incertidumbre asociada a la micropipeta.....	85
	Incertidumbre asociada a la densidad.....	85

Incertidumbre debida a la masa.	85
Incertidumbre final combinada.....	86
Incertidumbre asociada al cálculo de la concentración de la muestra.....	86
Incertidumbre asociada a la desviación estándar de los resultados de concentración de muestra.	87
Incertidumbre expandida.....	88
Anexo D. Método oficial AOAC 2017.08 Azufre total en fertilizantes.	89
Anexo E. Resultados por duplicado de la concentración de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos.....	92

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Rampa de temperatura para la digestión por microondas de las muestras enriquecidas para el desarrollo de la metodología de análisis de azufre por ICP-OES.	26
Cuadro 2. Condiciones instrumentales de operación del ICP-OES para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos.	28
Cuadro 3. Parámetros de desempeño por evaluar para la validación del método de análisis de azufre por ICP-OES y sus respectivos criterios de aceptación.	29
Cuadro 4. Resultados iniciales del porcentaje de recuperación de azufre a dos configuraciones de vista del plasma (axial y radial) y a dos longitudes de onda (180,669 nm y 181, 972 nm), por la técnica ICP-OES.	32
Cuadro 5. Resultados de porcentaje de recuperación de azufre con la incorporación de la solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio y con 10 segundos de lavado del automuestreador, por la técnica ICP-OES.....	33
Cuadro 6. Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de las dos masas de muestra para el análisis de azufre en fertilizantes por ICP-OES.	36
Cuadro 7. Prueba t para la evaluación de la selectividad del método de análisis de azufre por ICP-OES.	38
Cuadro 8. Resultados de límite de cuantificación y detección del método de análisis de azufre por ICP-OES.	38
Cuadro 9. Resultados para la evaluación de la veracidad del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.	39
Cuadro 10. Resultados para la evaluación de la repetibilidad del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.	39
Cuadro 11. Resultados para la evaluación de la precisión intermedia del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.	40
Cuadro 12. Resultados del porcentaje de azufre promedio obtenido bajo las condiciones originales del método (X) y las condiciones alteradas del método (x),	

para la evaluación de la robustez del método de análisis de azufre por ICP-OES. La desviación estándar (S) de los datos fue de 0,00139.	41
Cuadro 13. Concentración de azufre obtenida por los métodos analíticos ICP-OES y combustión AOAC 2017.08 en 14 muestras de fertilizantes inorgánicos, con su respectiva incertidumbre expandida y el resultado de cumplimiento con el RTCR 485:2016 de acuerdo con la concentración declarada.	45
Cuadro 14. Análisis de varianza para la comparación de dos métodos de análisis de azufre en fertilizantes: ICP-OES y combustión AOAC 2017.08.	48
Cuadro 15. Preparación de seis niveles de la curva de calibración de azufre para la validación del método de análisis de azufre por ICP-OES.	72
Cuadro 16. Combinación factorial de los parámetros analíticos para la evaluación de robustez del método de análisis de azufre por ICP-OES, mediante la prueba de Youden y Steiner.	77
Cuadro 17. Cálculo de los componentes de incertidumbre asociados a la masa medida en la balanza analítica.	86
Cuadro 18. Concentración de azufre obtenida por los métodos analíticos ICP-OES y combustión AOAC 2017.08 en 14 muestras de fertilizantes inorgánicos.	92

Lista de Figuras

Figura 1. Fuente del plasma acoplado inductivamente para la metodología de ICP-OES.	16
Figura 2. Proceso de atomización y ionización de los analitos en ICP-OES.	18
Figura 3. Configuraciones de vista de la zona analítica del plasma en la técnica de ICP-OES.	19
Figura 4. Componentes principales de un ICP-OES.	21
Figura 5. Espectro de emisión obtenido generalmente por la muestra de fertilizante enriquecida a 20,0 mg/L de azufre, visualizada en configuración axial y leídas a 180,669 nm (A) y 181,972 nm (B) respectivamente, por la técnica ICP-OES.	34
Figura 6. Espectro de emisión obtenido generalmente por la muestra de fertilizante enriquecida a 20,0 mg/L de azufre, visualizada en configuración radial y leídas a 180,669 nm (A) y 181,972 nm (B) respectivamente, por la técnica ICP-OES.	35
Figura 7. Resultados de la curva de calibración de azufre (A) y residuos de la regresión líneal (B) obtenidos mediante el método ICP-OES.	37
Figura 8. Diagrama de causa y efecto para la concentración de azufre obtenida mediante el método de ICP-OES.	43
Figura 9. Residuos del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de los supuestos del modelo.	49

Lista de acrónimos

ICP-OES	Espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
RTCR	Reglamento técnico en Costa Rica.
RTCA	Reglamento técnico Centroamericano.
LCC	Laboratorio de control de calidad de agroquímicos.
SFE	Servicio Fitosanitario del Estado.
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería.
UV-VIS	Ultravioleta – Visible.
HPLC-IE	Cromatografía líquida de alta resolución en modalidad de intercambio iónico.
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales.
CIA	Centro de Investigaciones Agronómicas.
UCR	Universidad de Costa Rica.
ECA	Ente Costarricense de Acreditación.
CEPAL	Comisión Económica para América Latina y el Caribe.
IFA	Asociación Internacional de Fertilizantes.
IPNI	Instituto Internacional de Nutrición Vegetal.
CTD	Detectores de transferencia de carga.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
r	Coefficiente de correlación.
CV	Coefficiente de variación.
PRSDR	Desviación estándar relativa prevista de reproducibilidad.

ANOVA	Análisis de varianza.
OMS	Organización mundial de la Salud.
LQ	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
F.D.	Factor de dilución.
EIE's	Elementos fácilmente ionizables.
μ_{FC}	Incertidumbre final combinada.
μ_{exp}	Incertidumbre expandida.
H₀	Hipótesis nula
H_a	Hipótesis alternativa

Resumen

Costa Rica se encuentra entre los países que presentan los mayores niveles de uso de fertilizantes en América Latina. Los fertilizantes están compuestos de nutrientes esenciales para la nutrición de las plantas entre los cuales se encuentra el azufre. Es por esto que una variación en la cantidad de azufre disponible, se verá reflejada en el crecimiento y rendimiento de los cultivos.

El Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos (LCC) es la entidad responsable en Costa Rica de monitorear la calidad de las sustancias químicas y biológicas de uso agrícola que se comercializan en el país. Actualmente, el LCC requiere optimizar el análisis de azufre en fertilizantes, y la técnica de ICP-OES representa una alternativa útil y novedosa, ante esta necesidad surge la presente investigación.

Durante el desarrollo de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos por ICP-OES, se incorporó una solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio, la cual permitió corregir las posibles interferencias de ionización. Además, se definió un tiempo de lavado del automuestreador de 10 segundos para mejorar la repetibilidad de los resultados. Por otro lado, se logró definir la configuración de vista del plasma de forma radial a una longitud de onda de 181,972 nm como las condiciones óptimas para el método.

Con respecto a la validación de la metodología, todos los parámetros de desempeño evaluados cumplieron con los criterios de aceptación definidos por el ECA (2012), el RTCR 485:2016 (2016) y la AOAC (2019). Se obtuvo un ámbito lineal en el intervalo de trabajo de 3,00 mg/L a 50,0 mg/L de azufre, un límite de detección de 0,00187 % y un límite de cuantificación de 0,00371 %.

La recuperación se mantuvo entre 98 % y 102 % en los tres niveles de concentración de azufre, evaluados para la veracidad. Por su parte, los coeficientes de variación se encontraron por debajo de los límites definidos por la AOAC para la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia. La evaluación de la robustez demostró que pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo no afectan significativamente el resultado de azufre obtenido. Por último, se obtuvo un

resultado de incertidumbre expandida de $(12,04 \pm 0,23)$ % m/m, este resultado corresponde a un 1,91 % del resultado de medida de azufre obtenido, y cumplió con el criterio de aceptación.

Se aplicó la metodología validada a 14 muestras que ingresaron al LCC, durante los meses de mayo y junio del 2020. A su vez, se comparó con la metodología AOAC 2017.08 Azufre total por combustión, mediante un análisis de varianza (ANOVA). Este demostró con un 95 % de confiabilidad, que no existe diferencia significativa entre los resultados del contenido de azufre obtenidos mediante los dos métodos de análisis comparados.

Palabras claves: azufre, fertilizantes inorgánicos, ICP-OES, AOAC, interferencias de ionización, validación, ANOVA.

Capítulo 1. Introducción

Según datos de la FAO, para el año 2030 la población mundial llegará aproximadamente a ocho mil millones de personas, por lo que se va a requerir un aumento de un 60 % en la producción de alimentos; y para lograrlo se necesita incrementar la eficacia en el uso de fertilizantes (Fresco, 2003). De acuerdo con Salvagiotti (2016), el uso de fertilizantes ha sido una de las herramientas más eficaces para corregir las deficiencias nutricionales de los cultivos.

Los fertilizantes están compuestos de nutrientes, minerales y otros elementos importantes, los cuales evitan que el terreno se seque y pierda fertilidad (Imbacuán, 2015); dentro de estos elementos esenciales se encuentra el azufre. La importancia del azufre en los fertilizantes radica en que las plantas lo requieren para diversos procesos fisiológicos, entre los cuales se encuentra la síntesis de proteínas (Romano, 2012; De Anda & Souza, 2016).

El azufre es un macronutriente esencial secundario en la nutrición de las plantas; su requerimiento es menor que los elementos esenciales primarios, sin embargo, es indispensable para el desarrollo normal de los cultivos, ya que, junto con el nitrógeno y el fósforo, componen los elementos estructurales para la nutrición de las plantas (Carrillo de Cori *et al.*, 2011; Brambilla, Baglioni, Pérez, Savio & Kloster, 2017).

La carencia de este elemento en las plantas, produce retardo en la maduración, reducción de la fotosíntesis, bajos contenidos de clorofila y alteraciones metabólicas, lo que implica un lento crecimiento de los cultivos y debilidad estructural en los tallos (Cánepa & Trémols, 2015). Con estas deficiencias se ven afectados los agricultores por la reducción en el rendimiento y la calidad de los cultivos (Carciochi, Divito, Reussi, & Echeverría, 2015).

En los últimos años, la cantidad de estudios relacionados con el azufre han disminuido, debido a factores como la disponibilidad en el suelo y los aportes atmosféricos, los cuales en el pasado cubrieron la demanda de este elemento (Echaverría & García, 2015). Sin embargo, actualmente, parte de la superficie a nivel mundial; presenta deficiencias (Morales & Gago, 2017). Para Romano (2012),

las principales razones de la deficiencia de azufre se resumen en la creación de regulaciones ambientales que limitan las emisiones de dióxido de azufre (SO₂) y el incremento en la aplicación de fertilizantes con mayor proporción de otros nutrientes y bajo contenido de azufre.

Resulta importante conocer la composición química de los fertilizantes, ya que una variación en la cantidad de nutrientes esenciales disponibles, se verá reflejada en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (García, 2015). La determinación de la composición química de los fertilizantes se rige, en Costa Rica, por el reglamento técnico RTCR 485:2016 (2016), el cual define las tolerancias y límites permitidos para la concentración de los elementos nutritivos, metales pesados e impurezas en fertilizantes y enmiendas para uso agrícola.

La entidad responsable de monitorear la calidad de los fertilizantes en Costa Rica, es el Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos (LCC), según el reglamento técnico RTCR 318:1998 (1999) (laboratorios para el análisis de sustancias químicas y biológicas de uso en la agricultura). Este laboratorio pertenece al Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), que es un organismo adscrito al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).

Para el control de calidad de azufre en fertilizantes, actualmente el LCC realiza la determinación de azufre total por la técnica de combustión. Sin embargo, esta metodología presenta varias limitantes, por lo cual se hace necesario desarrollar una metodología adecuada que sea capaz de determinar todas las fuentes de azufre en fertilizantes inorgánicos, y que, además, garantice la emisión de resultados técnicamente válidos.

Por su parte, la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) presenta ventajas como el análisis multielemental, la baja susceptibilidad a interferencias químicas y una mayor simplicidad y sensibilidad en el análisis (Oliveira *et al.* 2016; García, 2015). Asimismo, la alta energía del plasma de argón de esta técnica, logra excitar todos los átomos e iones que constituyen la muestra sin importar su origen (Agilent

Technologies, 2012). Por lo cual, la técnica ICP-OES representa una alternativa útil y novedosa para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos.

1.1 Antecedentes

El método analítico utilizado para la determinación de azufre en fertilizantes depende del origen orgánico e inorgánico de la muestra (Carrillo de Cori *et al.*, 2011). Para estos autores, en la mayoría de las metodologías se requiere la transformación del azufre a sulfato para su determinación, debido a que se da la extracción o precipitación del azufre en forma de sulfato de bario.

Según Acosta (2015), entre los principales métodos instrumentales para el análisis de azufre se citan: la espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-VIS), la turbidimetría, el plasma acoplado inductivamente (ICP, por sus siglas en inglés), los rayos X, la cromatografía líquida de alta resolución en modalidad de intercambio iónico (HPLC-IE por sus siglas en inglés) y el analizador de azufre por combustión.

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (2019) (AOAC por sus siglas en inglés) indica dos metodologías normalizadas para el análisis de azufre en fertilizantes, las cuales corresponden a AOAC 980.02 (determinación de azufre en fertilizantes por gravimetría) y AOAC 2017.08 (determinación de azufre total en fertilizantes por combustión). En los siguientes párrafos, se mencionan diversos estudios a nivel nacional e internacional, en donde se han realizado investigaciones relacionadas con el análisis de azufre en fertilizantes, así como las respectivas metodologías y técnicas instrumentales aplicadas.

Bosnak (2004) desarrolló una metodología de análisis multielemental de alto rendimiento en suelos agrícolas en Illinois, Estados Unidos, mediante la técnica ICP-OES. La autora menciona que esto permitió optimizar el análisis y reducir la carga de trabajo del laboratorio, ya que se pasó de utilizar tres equipos de absorción atómica a analizar una muestra de suelo con 11 elementos importantes cada 30 segundos y con un solo instrumento. Además, logró determinar simultáneamente elementos que normalmente debían realizarse mediante técnicas alternativas, como lo son el azufre, el fósforo y el boro.

Carrillo de Cori *et al.* (2011) desarrollaron un método turbidimétrico para el análisis de azufre en plantas en Venezuela. Se logró comprobar que la adaptación del método es una opción práctica, exacta y precisa, debido a que se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 101,79 %, el cual se encuentra dentro del rango aceptado. Además, se realizó una comparación entre esta metodología y la gravimétrica, con lo cual se comprobó que el método gravimétrico, a pesar de tener una mayor precisión, presenta la interferencia del ion amonio, la cual causa falsos negativos en la cuantificación del azufre.

Por su parte, Pachacama (2013), en su investigación realizada en Ecuador, optimizó un método para el análisis de azufre, boro y fósforo en tejido foliar de banano y rosas por ICP-OES, con extracción mediante digestión ácida en horno microondas. Se obtuvo un análisis multielemental con baja susceptibilidad a interferencias químicas, presentes en la metodología fotocolorimétrica que se aplicaba en el pasado en el laboratorio. Además, el autor logró mejorar los tiempos de trabajo, ya que la técnica ICP-OES permite el análisis simultáneo de los elementos.

En un estudio realizado por Oliveira, Rampazzo, Ferrão y Pozebon (2016), se desarrolló un método para la determinación de boro, azufre y fósforo en fertilizantes minerales; mediante la técnica ICP-OES. De esta manera, se lograron obtener resultados satisfactorios en cuanto a los porcentajes de recuperación de materiales de referencia certificados e interlaboratoriales. Además, se encontró que, para una determinación precisa de azufre elemental, la muestra debe someterse a una digestión cerrada en horno microondas durante 20 minutos.

Según Oliveira *et al.* (2016), la mayoría de los métodos oficiales aplicados en el análisis de elementos nutritivos en fertilizantes en Brasil, corresponden a métodos volumétricos y gravimétricos; los cuales muestran deficiencias al compararse con métodos instrumentales novedosos, como la técnica ICP-OES. Con esta técnica se obtiene mayor simplicidad y sensibilidad en el análisis, y una baja susceptibilidad a interferencias químicas, gracias al ajuste de parámetros instrumentales multivariados, lo cual permite eliminar los efectos de la matriz. Por su parte, García

(2015) indica que la técnica ICP-OES merece investigación, ya que permite una amplia cobertura elemental.

En Costa Rica, en el Laboratorio de Suelos y Foliareos del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, se cuenta con una metodología para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos, la cual consiste en una digestión con ácido nítrico en microondas y la posterior lectura por la técnica de ICP-OES, a una longitud de onda de 180,669 nm (W. Rodríguez, comunicación personal, 24 de abril de 2019). Es importante indicar que dicha metodología aún no se ha validado. También es necesario mencionar que, para lograr el reconocimiento formal de la competencia técnica de un laboratorio, según lo que establece el Ente Costarricense de Acreditación en su política de validación de métodos (ECA-MC-PO01), el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto y las verificaciones necesarias para confirmar que dichos métodos son aptos para el fin previsto (ECA, 2014b).

En el área de la agricultura, el análisis de azufre es de suma relevancia en matrices como suelo, foliares y fertilizantes. La presente revisión de literatura demuestra que los métodos turbidimétricos y gravimétricos se pueden ver afectados por interferencias en la cuantificación del azufre. Por otro lado, se demuestra que la técnica de ICP-OES es un método nuevo que presenta ventajas importantes entre las que se citan; el análisis multielemental, la baja susceptibilidad a interferencias químicas y una mayor simplicidad y sensibilidad en el análisis. Esto implica que la aplicación de métodos instrumentales novedosos como el ICP-OES, representa una oportunidad para optimizar el análisis de azufre en fertilizantes.

1.2 Justificación

Según el anuario estadístico de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), durante el período de 2006 a 2012, en esta región la intensidad en el uso de fertilizantes se incrementó en función de áreas cultivadas en un 27,1 % (CEPAL, 2014). En este mismo documento, se resalta a Costa Rica, Barbados, Trinidad y Tobago, Honduras, Guatemala y El Salvador, como los países que

presentan mayores niveles de uso de fertilizantes, si se comparan con el resto de los países de América Latina (Reyes & Cortés, 2017).

En Costa Rica, el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), es el responsable del registro a nivel nacional, control de calidad y regulación de sustancias químicas y biológicas de uso agrícola (plaguicidas, fertilizantes, sustancias biológicas y otros productos afines). A su vez, el Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos (LCC) del SFE es el laboratorio responsable de monitorear la calidad de las sustancias químicas y biológicas de uso agrícola que se comercializan en el país.

Para el análisis de azufre en fertilizantes, actualmente el LCC realiza la determinación por el método de combustión AOAC 2017.08. Sin embargo, esta metodología presenta varias limitantes, por lo cual se hace necesario buscar otra técnica de análisis como lo es el ICP-OES. Algunas de las limitantes del método de combustión se detallan a continuación:

Con los recursos actuales del laboratorio, el método de combustión no es capaz de determinar las diversas fuentes de origen del azufre. Con el método de combustión se han obtenido falsos negativos cuando la fuente de azufre es el tiosulfato (D. Víquez, comunicación personal, 24 de abril del 2019, encargado del análisis de fertilizantes en el LCC). En contraste, la alta energía del plasma de argón en la técnica ICP-OES, logra excitar todos los átomos y iones que constituyen la muestra sin importar su origen (Agilent Technologies, 2012).

En este mismo contexto, es hasta el año 2016, con el reglamento técnico RTCA 65.05.54:15 (2016), que se exige a quienes registran fertilizantes, la declaración de la fuente de los elementos contenidos en los productos. Esto implica que, para los fertilizantes registrados antes del año 2016, la fuente de azufre es desconocida. Como se mencionó en el párrafo anterior, en algunas ocasiones, al realizarse el análisis por la técnica de combustión, se obtuvieron porcentajes de azufre menores al reportado en la formulación. Este error se debe a que la fuente de azufre era el tiosulfato, aspecto que genera pérdida de recursos y de tiempo en el laboratorio, debido a retrabajos.

Otro aspecto importante es que el equipo usado para el método de combustión está en constante desperfecto y el laboratorio no cuenta con los recursos económicos necesarios para cubrir las reparaciones. Así, por ejemplo, en el periodo de diciembre de 2016 a agosto de 2017, el laboratorio no realizó análisis de azufre en fertilizantes por combustión, debido a un daño en el detector (D. Viquez, comunicación personal, 24 de abril de 2019).

Por otro lado, Fanego-Hernández y Carabeo-Pérez (2017) señalan que con la técnica ICP-OES se logran buenos espectros para la mayoría de los elementos con las mismas condiciones de excitación, lo que hace posible registrar simultáneamente los espectros de varios elementos. Es decir, esta técnica permite el análisis de otros elementos en fertilizantes, lo cual aumenta el rendimiento del laboratorio. En la actualidad, el LCC posee una metodología por ICP-OES para el análisis de metales pesados en fertilizantes. Por lo tanto, para el laboratorio es más rentable contar con un equipo de análisis multielemental; que invertir en un equipo que solamente analice un elemento.

Asimismo, se han presentado quejas por parte de las empresas fiscalizadas, las cuales solicitan que el laboratorio cuente con una metodología adecuada para analizar las diferentes fuentes de azufre. Según lo establece el Decreto Ejecutivo N° 36801-MAG, Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Fitosanitario del Estado (2011), el LCC es el responsable de implementar metodologías de análisis físicos y químicos para determinar las características de los agroquímicos. Por lo tanto, al LCC le corresponde desarrollar una metodología adecuada que garantice la emisión de resultados técnicamente válidos.

Ante la necesidad de optimizar los análisis de azufre en fertilizantes en el LCC, surge la presente investigación, la cual tiene como objetivo desarrollar y validar una metodología para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por medio de la técnica ICP-OES, y su posterior comparación con la metodología oficial de análisis de azufre total en fertilizantes AOAC 2017.08, que se aplica actualmente.

1.3 Objetivo general y objetivos específicos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar y validar una metodología para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

1.3.2 Objetivos específicos

- Elaborar una metodología para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.
- Validar la metodología para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente, de acuerdo con la guía de validación de métodos ECA-MC-PO01-G01 del Ente Costarricense de Acreditación.
- Comparar estadísticamente los resultados del contenido de azufre en muestras de fertilizantes inorgánicos que ingresan al Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos durante los meses de mayo y junio del 2020, mediante la determinación por el método ICP-OES y por el método de combustión AOAC 2017.08.

Capítulo 2. Marco Teórico.

2.1 Generalidades de los fertilizantes.

Un fertilizante es definido como un producto de origen natural o sintético, que, aplicado al suelo o sustrato, proporciona nutrientes disponibles a la planta. Puede ser suministrado directamente o formar parte de la composición de otras sustancias (Peláez, 2015).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), para lograr un mayor crecimiento y rendimiento en los cultivos se requiere el suministro de nutrientes en el suelo. Para lo cual son necesarios los fertilizantes, debido a que estos proveen al suelo los nutrientes de los cuales carecen y en consecuencia mejoran su fertilidad. Sin embargo, si la provisión de uno solo de los nutrientes necesarios es escaso, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos será reducido (FAO, 2002).

Para Ladha, Pathak, Krupnik, Six y Kessel (2005), el uso de fertilizantes representa una estrategia llevada a cabo por las entidades gubernamentales y privadas con el fin de lograr el nivel de producción de alimentos requerido por una población mundial en crecimiento; de manera que actualmente un 50 % de la población mundial depende de fertilizantes para la necesaria producción de alimentos.

Según la Asociación Internacional de Fertilizantes (IFA, por sus siglas en inglés), existen dos tipos de fertilizantes:

- **Fertilizantes minerales o inorgánicos:** Generalmente son producidos a partir de la extracción de depósitos de nutrientes naturales. Estos contienen altas concentraciones de uno, dos o tres nutrientes vegetales.
- **Fertilizantes Orgánicos:** Proviene de materia vegetal, excretas animales, aguas residuales y residuos alimentarios, generalmente en forma de estiércol animal, estiércol verde y biosólidos. Estos proporcionan una amplia variedad en bajas concentraciones de los nutrientes esenciales que necesitan los cultivos (IFA, 2018, p. 2).

2.2 Elementos esenciales para las plantas.

Para IFA (2019) existen 17 elementos esenciales para las plantas: el carbono, el hidrógeno y el oxígeno que se obtienen de la atmósfera y el agua; los 14 restantes son elementos minerales obtenidos del suelo y se pueden clasificar en tres grupos: macronutrientes primarios, macronutrientes secundarios y los micronutrientes.

Los macronutrientes primarios (nitrógeno, fósforo y potasio) son requeridos por las plantas en cantidades relativamente grandes. Los macronutrientes secundarios (azufre, magnesio y calcio) son igual de necesarios para el crecimiento de las plantas que los primarios, sin embargo, se necesitan en cantidades menores. Por su parte, los micronutrientes (hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno, cloro y níquel) son demandados en pequeñas cantidades (Reetz, 2016).

2.3 Azufre.

El azufre (S) representa uno de los elementos más abundantes en la Tierra y se puede encontrar en el suelo, tanto de forma orgánica como inorgánica. Químicamente, el azufre posee ocho estados de oxidación, es decir, este elemento puede tomar diferentes formas químicas que se pueden transportar en la naturaleza de manera abiótica y biótica por diferentes grupos bacterianos (De Anda & Souza, 2016).

Cánepa y Trémols (2015) señalan que el azufre es uno de los nutrientes más requeridos por las plantas, debido a que participa en la formación de proteínas, azúcares, raíces, glucosinolato y clorofila. Además, interviene en la producción de semillas, en la síntesis de grasas, aceites y vitaminas, reduce la acumulación de almidones en las hojas y mejora la eficiencia en el uso del nitrógeno. El contenido de este elemento en las plantas varía entre 0,1 % y 0,5 % en peso seco (Salas, 2003).

Como elemento fundamental para la vida en el planeta, se encuentra en aminoácidos esenciales como la cisteína y la metionina; y en coenzimas y cofactores presentes en todos los seres vivos, cuya función es esencial en muchos procesos metabólicos y celulares fundamentales; a saber, la fijación del carbono,

asimilación de lípidos y carbohidratos, síntesis de azúcares, duplicación celular, replicación de ADN, la fotosíntesis, la respiración y la regulación génica (De Anda & Souza, 2016).

El azufre está ligado principalmente a la materia orgánica del suelo, y su dinámica es muy similar a la del nitrógeno, por tanto, los requisitos de azufre y nitrógeno para los cultivos, están estrechamente relacionados, debido a que ambos se utilizan para síntesis de proteínas y clorofila (Malhi & Karamanos, 2014).

Para Molina y Henríquez (2003), la deficiencia de azufre es confundida con la del nitrógeno, y los productores se centran en suministrar altas concentraciones de nitrógeno a sus cultivos. Sin embargo, cabe resaltar que el azufre es fundamental para el aprovechamiento del nitrógeno; ya que una vez que el nitrógeno se acumuló como nitrato libre en las hojas, debe ser transformado en proteína, para lo cual se requiere la intervención de una enzima llamada nitrato reductasa, en la que el azufre es uno de sus principales componentes (Loewy, Pugliese & Ron, 2008).

En una investigación realizada por Salvagiotti y Miralles (2008), con el propósito de determinar la influencia de nitrógeno y azufre en el cultivo del trigo, sus efectos sobre el rendimiento y la tasa de crecimiento del cultivo; se encontró una interacción positiva entre el nitrógeno y el azufre, la cual demostró un aumento en la eficiencia del uso de nitrógeno por parte del cultivo, cuando no se presentaban deficiencias de azufre.

2.4 El ciclo biogeoquímico del azufre.

Las plantas obtienen el azufre principalmente del suelo en forma de sulfato. Es por esto que la mayoría de los fertilizantes lo presentan de esta forma. En pocas ocasiones, el azufre atmosférico es absorbido por las hojas de las plantas en forma de dióxido de azufre, sin embargo; no es representativo para las necesidades de los cultivos (Carrillo de Cori, *et al.* 2011). Por otra parte, el azufre se pierde del suelo por procesos de lixiviación, erosión, translocación y por la volatilización de la planta, sobre todo en sus formas reducidas o como SO₂ (Lucheta & Lambais, 2012).

Cabildo *et al.* (2013), mencionan que el azufre se encuentra en la atmósfera en su mayoría en forma de sulfatos disponibles en el suelo. Los sulfatos son

imprescindibles para la síntesis de moléculas orgánicas y solamente las plantas, bacterias y hongos son capaces de incorporarlos directamente para reducirlos a trióxido de azufre y posteriormente a sulfuro de hidrógeno (H_2S). De esta manera son transferidos a los demás niveles tróficos. Los cadáveres y desechos de los productores y consumidores son desintegrados por medio de los saprófagos, proceso mediante el cual liberan el H_2S a la atmósfera y demás sistemas terrestres.

En los océanos y lugares pantanosos donde hay ausencia de oxígeno, el sulfato se reduce a H_2S mediante bacterias sulfatorreductoras, proceso mediante el cual se libera oxígeno, el cual es aprovechado por otros organismos para respirar. De ahí, el H_2S tiene dos caminos, ascender hasta alcanzar lugares con oxígeno donde se oxida nuevamente a sulfato mediante un proceso fotosintético o quimiosintético (en función de la ausencia o presencia de luz); o descender, en donde al combinarse con el hierro, precipita en forma de pirita (FeS).

En la atmósfera el H_2S es oxidado, y se forma ácido sulfúrico (H_2SO_4), el cual representa un núcleo de condensación que favorece las lluvias, las cuales devuelven el azufre al mar o a la tierra. De esta manera se cierra el ciclo del azufre. Adicionalmente, los volcanes, industrias y la quema de combustibles fósiles aportan a la atmósfera SO_2 , el cual origina problemas de lluvia ácida.

2.5 Fuentes de azufre en fertilizantes.

Según Acosta (2015), el azufre es propio de regiones volcánicas. En sus estados reducidos forma sulfuros y sus sales, o bien, en las formas oxidadas como sulfatos. De acuerdo con un informe del Instituto Internacional de Nutrición Vegetal (IPNI, por sus siglas en inglés), las fuentes de azufre en fertilizantes minerales pueden dividirse según su solubilidad en agua en tres grupos:

- No solubles, como el azufre elemental, el cual debe ser oxidado por las bacterias del suelo a sulfato, antes de ser absorbido por las raíces de las plantas mediante la reacción: $2S + 3O_2 + 2H_2 \rightarrow 2H_2SO_4$.
- Semisoluble en agua como en el caso del yeso, el cual contiene entre 15 % y 17 % de azufre. El yeso se disuelve en el agua para liberar calcio y sulfatos.

- Soluble en agua, como el sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$, uno de los primeros y más utilizados fertilizantes nitrogenados para la producción de cultivos, especialmente valioso cuando se requiere nitrógeno y azufre para la nutrición de los mismos. Además, se encuentra el sulfato de potasio (K_2SO_4), el sulfato de potasio y magnesio (langbeinita, 22 % azufre), la kieserita (23 % azufre), la sal de Epsom (13 % azufre), y los tiosulfatos (entre 10 % y 26 % de azufre) (IPNI, 2019, p.1).

2.6 Técnicas de análisis de azufre en fertilizantes.

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (2019) (AOAC por sus siglas en inglés) establece dos metodologías oficiales para el análisis de azufre en fertilizantes, la determinación de azufre en fertilizantes por gravimetría (AOAC 980.02) y la determinación de azufre total en fertilizantes por combustión (AOAC 2017.08).

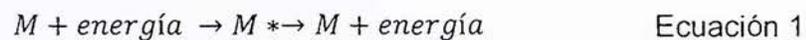
El método gravimétrico se basa en generar la precipitación del azufre contenido en la muestra en forma de sulfato. Mediante la adición de cloruro de bario se da la precipitación de sulfato de bario, el cual posteriormente se seca, se pesa y se calcula el contenido de sulfato presente (Carrillo de Cori *et al.* 2011).

Por otra parte, el método por combustión consiste en colocar la muestra en un horno de combustión, el cual cuenta con un flujo constante de oxígeno y una temperatura de 1350 °C. Estos factores causan la combustión de la muestra, y genera que el azufre contenido en la muestra sea liberado y oxidado a dióxido de azufre (SO_2). Este gas es conducido hasta la parte final del tubo de combustión en donde permanecerá hasta alcanzar una oxidación eficiente. El flujo de gases generado de la combustión de la muestra pasa a través de dos tubos que contienen cloruro de calcio, el cual tiene la función de eliminar la humedad presente en la muestra, mediante un regulador de flujo, que fija dicho flujo de gases de la muestra. Posteriormente, este flujo pasará a través de la celda de detección infrarroja que detecta la concentración de SO_2 . Por último, mediante un microprocesador se calcula la concentración de azufre contenido en la muestra, a partir de la masa

inicial, la señal integrada del detector y una curva de calibración (Fernández-Feal, Escudero & Pérez-Prado, 2009).

2.7 Fundamento de la espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Los métodos atómicos de emisión se basan en la medida de la radiación emitida por los átomos de una muestra previamente excitados (Miró, 2017); el proceso en general se simplifica en la Ecuación 1:



En donde:

M: átomos o moléculas en estado fundamental.

M*: átomos o moléculas excitados.

Según el autor, la disociación de cualquier compuesto químico en sus elementos ionizados se produce gracias a que la cantidad de energía requerida para excitar la mayoría de los elementos es muy grande; lo cual genera que el espectro de emisión sea característico de los átomos presentes en la muestra, constituido por un conjunto de líneas finas y bien definidas. Esta interacción es tan específica que permite identificar el tipo y la cantidad de materia que se encuentra presente (González & Montaña, 2015).

Para Miró (2017), la fuente de energía debe ser estable, debido a que las fluctuaciones conducen a una medida errónea, Además debe tener la capacidad de disociar el analito de su matriz, poseer la intensidad suficiente para que se produzca una correcta atomización de esta, y no debe interferir con la medida del equipo para no afectar a la precisión del resultado.

2.7.1. Sistema de introducción de la muestra.

El proceso de introducción de la muestra se lleva a cabo por una bomba peristáltica, el nebulizador y la cámara de nebulización. La muestra, normalmente en estado líquido, es bombeada mediante una bomba peristáltica hacia el

nebulizador (González, 2012). En el nebulizador, se transforma la muestra líquida en un conjunto de gotas suspendidas en un gas, el cual se consigue mediante el aporte de energía al líquido, para de esta manera vencer las fuerzas de cohesión (Lúñez, 2016).

Sin embargo, Lagos (2016) aporta que un sistema de introducción de la muestra ideal debe proporcionar gotas finas con diámetros $\leq 10 \mu\text{m}$; debido a que gotas con diámetros cercanos a $25 \mu\text{m}$ no podrán ser desolvatadas completamente. Por lo tanto, después del nebulizador, la muestra pasa a una cámara de nebulización, que tiene como principal función el actuar como un filtro para adecuar las características del aerosol generado a los requerimientos de la fuente de atomización. Adicionalmente, la cámara de nebulización actúa sobre la velocidad de las gotas del aerosol (Aguirre, 2015), igualando las velocidades de las gotas a la del gas portador y haciendo el flujo lo más laminar posible. Posteriormente la muestra es dirigida a la antorcha del plasma.

Es importante mencionar que el proceso de introducción de la muestra representa un factor crítico, cuando se requieren límites de detección específicos (Lúñez, 2016).

2.7.2. La fuente del plasma.

El lugar donde se forma el plasma se denomina antorcha, la misma consiste en tres tubos de cuarzo concéntricos (Manzano, Garrido, & Jiménez, 2018). Miró (2017) explica la generación del plasma como un proceso de excitación radiomagnética del gas argón. El gas fluye a través de un tubo de cuarzo, el cual es rodeado en su extremo superior por tres o cuatro anillos de una bobina Tesla de inducción alimentada por un generador de radiofrecuencia. Esta frecuencia de operación se encuentra entre 27 MHz y 40 MHz y la potencia entre 700 W a 1500 W. A través de la bobina de inducción fluye una corriente de alta frecuencia que genera campos magnéticos oscilantes.

Esta bobina Tesla de inducción rodea la antorcha y produce una descarga que inicia la ionización del argón que fluye por el interior del tubo. Los iones que se producen en esta descarga y sus electrones interaccionan con el campo magnético

oscilante y producen un movimiento en trayectorias anulares cerradas. Los iones encuentran resistencia a dicho movimiento, lo cual causa un calentamiento óhmico (Miró, 2017).

Una vez formado el plasma, se autoalimenta gracias a las posteriores colisiones con otros átomos gaseosos, que hacen que se propague la ionización y por lo tanto que el plasma se mantenga por sí mismo. El resultado es un gas altamente ionizado con temperaturas entre 6000 K y 10000 K (Lagos, 2016).

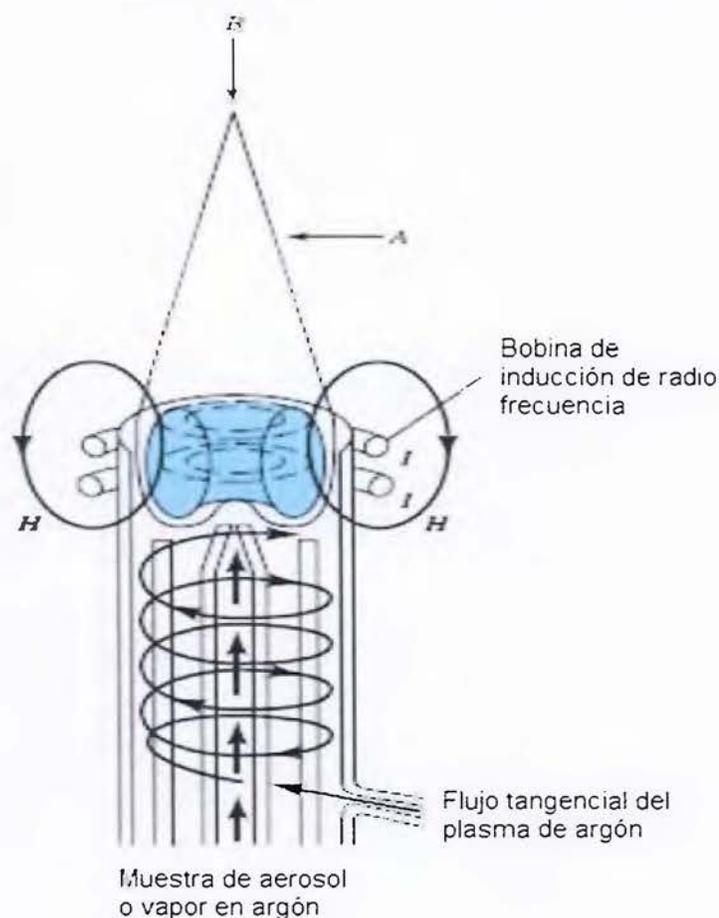


Figura 1. Fuente del plasma acoplado inductivamente para la metodología de ICP-OES. Fuente: Adaptado de *Determinación de azufre, boro y fósforo en tejido foliar por espectrofotometría de emisión por acoplamiento de plasma inductivo y detección óptica (ICP-OES)* (p. 33), por Pachacama, 2013.

Las altas temperaturas del plasma formado, requieren un aislamiento térmico, para lo cual se hace fluir argón tangencialmente alrededor de las paredes del tubo central (Figura 1), de manera que se logre enfriar la pared del mismo y centrar el plasma radialmente (Pachacama, 2013).

Resulta importante mencionar que el plasma va a tener tres zonas de temperatura distintas: el área inferior donde se da la desolvatación, disociación y atomización del aerosol de muestra, la zona central o zona analítica que representa la emisión de átomos ionizados y, por último, el área refrigerante que corresponde al área superior denominada cola del plasma (Agilent Technologies, 2012).

2.7.3. Atomización e ionización de los analitos.

Una vez que la muestra es convertida en aerosol, este aerosol es desolvatado, vaporizado, atomizado, excitado y luego ionizado (Figura 2) (Rinaldi, 2015). Este proceso se define a continuación:

- **Desolvatación:** El plasma formado a altas temperaturas, permite eliminar el disolvente y obtener micropartículas sólidas de la muestra o un aerosol seco.
- **Vaporización:** Las micropartículas son disociadas en moléculas individuales en estado gaseoso.
- **Atomización:** Las moléculas individuales se disocian en átomos.
- **Excitación e ionización:** Para que un átomo pueda emitir su radiación característica, uno de sus electrones debe ser promovido a un nivel de energía mayor, por medio de un proceso de excitación (ionización), lo cual genera la emisión de radiación (Pachacama, 2013, p.25).

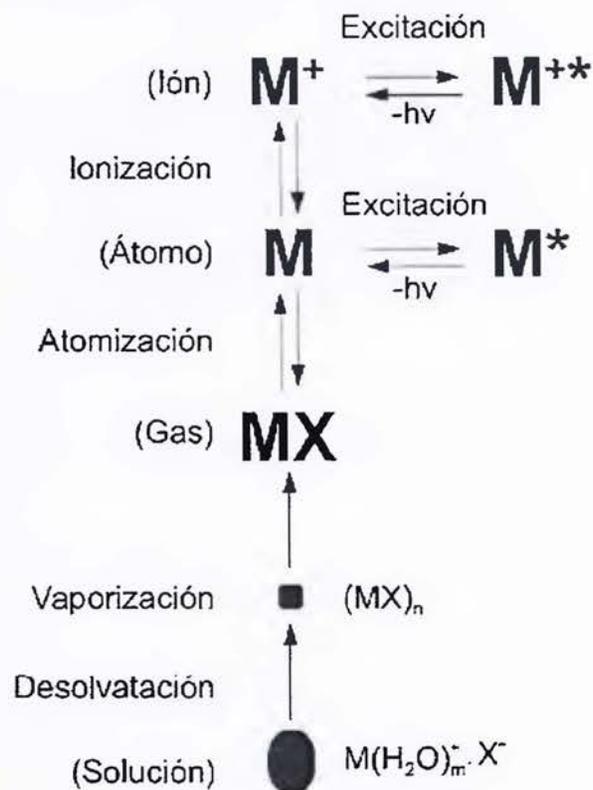


Figura 2. Proceso de atomización e ionización de los analitos en ICP-OES.
 Fuente: Adaptado de *Estudio de los contenidos de elementos inorgánicos de interés ambiental en suelos afectados por derrames de combustibles derivados del petróleo* (p. 45), por Rinaldi, 2015.

2.7.4. Configuración de vista del plasma.

Existen tres posibles configuraciones de vista de la zona analítica del plasma:

1. Vista Radial, verticalmente orientada.
2. Vista Axial, horizontalmente orientada.
3. Vista dual: axial y radial. (Agilent Technologies, 2012, p.2).

En la vista radial la zona analítica del plasma se observa de lado. Esta configuración tiene una mayor tolerancia a altos sólidos disueltos y matrices complejas, sin embargo, se obtiene una sensibilidad menor que con la configuración axial (Lagos, 2016).

Con la configuración axial del plasma, se observa toda la extensión del plasma según un eje central, por lo que ofrece mayor sensibilidad y mejora los límites de detección (entre 4 a 10 veces); sin embargo, tienen mayor susceptibilidad a las interferencias provenientes de la matriz (Lagos, 2016).

Por último, en la configuración dual la vista axial es combinada con un intercambio automático hacia la vista radial a través del sistema óptico (Lagos, 2016). Lo anterior se detalla gráficamente en la Figura 3.

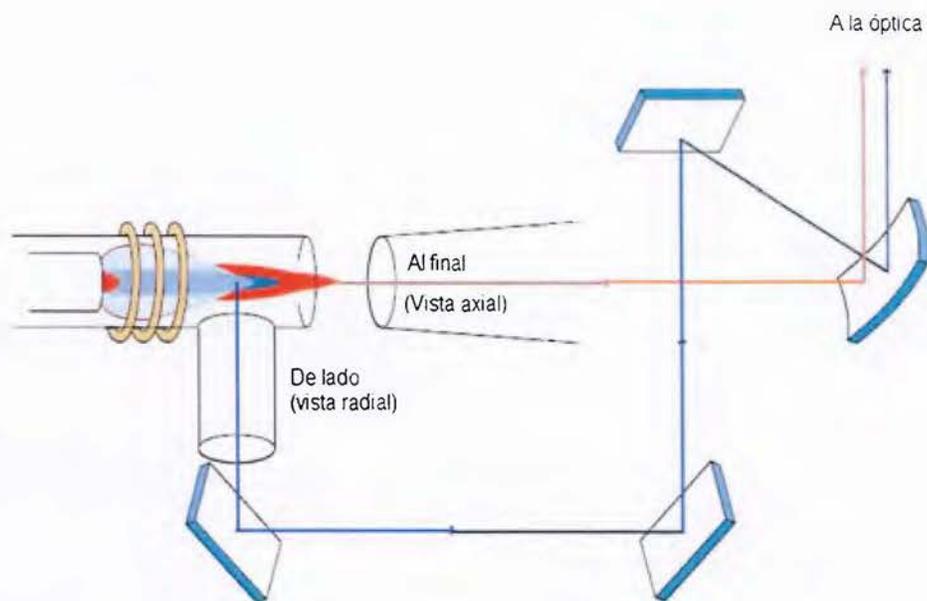


Figura 3. Configuraciones de vista de la zona analítica del plasma en la técnica de ICP-OES. Fuente: Adaptado de *Dedicated axial or radial plasma view for superior speed and performance* (p. 5), por Agilent Technologies, 2012.

2.7.5. Sistema óptico.

La radiación emitida por átomos y iones de la muestra es separada espectralmente por el sistema óptico. De acuerdo con Aguirre (2015), la función del sistema óptico es separar cada una de las radiaciones monocromáticas que componen el haz policromático que emiten los átomos excitados de la muestra. Para realizarlo, se cuenta con un dispositivo de dispersión que puede ser un monocromador (una sola rendija de salida y un detector) o un policromador. En este último caso, se emplean múltiples rendijas de salida y detectores en el mismo sistema, lo cual permite un análisis multielemental simultáneo.

Un espectrómetro ideal debería determinar todas las longitudes de onda entre 160 nm y 860 nm. Cabe resaltar que una manera de mejorar la sensibilidad a longitudes de onda por debajo de 200 nm es purgando el espectrómetro con argón, nitrógeno o mediante el uso de una bomba de vacío (Lagos, 2016).

2.7.6. Detección de la radiación emitida.

Para la espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente se prefieren los detectores de transferencia de carga (CTD, por sus siglas en inglés). En estos, la longitud de onda seleccionada es direccionada hacia el detector, en donde la luz (fotones) se convierte en una carga cuantificable. Los fotones liberan electrones en el sustrato del detector, lo cuales serán atrapados en los pixeles, de manera que cada pixel es capaz de almacenar un número de electrones. La señal posteriormente será digitalizada y manifestada como cuentas (Lagos, 2016). En síntesis, la Figura 4 resume los componentes principales de un ICP-OES.

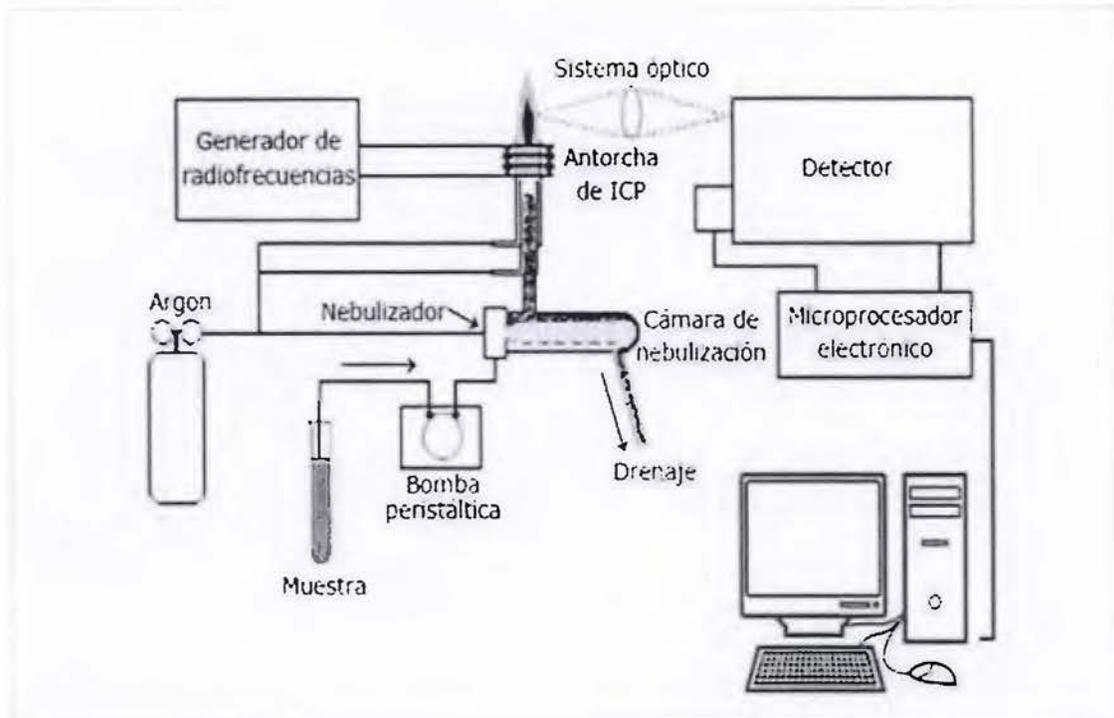


Figura 4. Componentes principales de un ICP-OES. Fuente: Adaptado de Técnicas de investigación avanzadas en Agronomía y ciencias afines (p. 81), por Manzano, Garrido, & Jiménez, 2018, Universidad Almería.

2.7.7. Ventajas del ICP-OES.

Para Rinaldi (2015) con la espectroscopía de absorción atómica con plasma acoplado inductivamente, se logra alcanzar una temperatura mucho más alta que la de otras técnicas utilizadas. Aspectos como su elevada temperatura, su estabilidad y su entorno químico inerte de argón, son capaces de eliminar gran parte de las limitaciones, de manera que se logra excitar gran cantidad de elementos.

Por su parte, Miró (2017) aporta que actualmente la técnica ICP-OES es una de las más potentes y populares. Se mencionan las siguientes ventajas:

1. Temperaturas elevadas (hasta 10000 K) que permiten la determinación de elementos refractarios.
2. Buen grado de ionización de muchos elementos.
3. Capacidad simultánea multielemental (aproximadamente 70 elementos incluyendo fósforo y azufre).

4. La temperatura y el tiempo de residencia del analito en la antorcha de plasma, hace que la atomización sea más completa y haya menos problemas de interferencias químicas.
5. Elevada estabilidad, que conlleva una excelente precisión.
6. Excelentes límites de detección para muchos elementos (0,100 - 100 ng/ml⁻¹), mejores que con emisión de llama, arco o chispa.
7. Curvas de calibración con amplios márgenes lineales (hasta 4 o 5 órdenes de magnitud) (Miró, 2017, p.143).

2.8 Validación.

El Ente Costarricense de Acreditación en su política de validación de métodos (ECA-MC-PO01), define la validación de un método analítico como el proceso de establecer los parámetros y las limitaciones de desempeño del método, así como de identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones. Permite demostrar que el método es adecuado para el propósito (ECA, 2014b).

Asimismo, establece los lineamientos que deben cumplir los laboratorios con respecto a la validación de sus métodos no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto y las verificaciones necesarias para confirmar que el laboratorio puede aplicar correctamente los procedimientos normalizados antes de utilizarlos (ECA, 2014b).

El ECA dispone de una guía de validación de métodos (ECA-MC-PO01-G01), en donde establece el alcance de validación para métodos no normalizados o desarrollados por el laboratorio; e indica que para la determinación cuantitativa de componentes mayoritarios se deben evaluar los siguientes parámetros de desempeño: selectividad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad y/o precisión intermedia), veracidad, ámbito de trabajo, robustez, e incertidumbre. Y en el caso de que aplique: especificidad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación (ECA, 2014a).

Los parámetros de desempeño mencionados en párrafos anteriores se definen a continuación:

Selectividad: Capacidad de un método para cuantificar un analito en presencia de interferencias o la habilidad de un método para determinar específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz, bajo condiciones establecidas de prueba.

Precisión: Proximidad entre los resultados de mediciones independientes, obtenidos bajo las mismas condiciones específicas. La precisión incluye la repetibilidad y reproducibilidad y/o precisión intermedia.

Repetibilidad: Grado de concordancia entre datos obtenido aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, con el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipamiento, dentro de un mismo laboratorio, es decir bajo las mismas condiciones.

Precisión intermedia: Precisión obtenida aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, en el mismo laboratorio, bajo condiciones diferentes de operación. Estas condiciones pueden estar relacionadas con las siguientes variables: tiempo, operador, equipamiento o calibración

Veracidad: Es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado.

Intervalo o Ámbito de trabajo: Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el que, la señal de respuesta del sistema de medición tendrá una relación lineal con la concentración del analito o el valor de la propiedad.

Robustez: Capacidad de un método para emitir los mismos resultados ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Incertidumbre: Es un parámetro, no negativo asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando.

Especificidad: Capacidad del método de dar negativo, cuando las muestras no tienen el analito.

Linealidad: Capacidad de un método de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Límite de detección: Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

Límite de cuantificación: Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas. Los límites de cuantificación son característicos de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para cuantificar adecuadamente un analito (ECA, 2014b, pp.3-7).

Capítulo 3. Marco Metodológico.

3.1 Lugar de investigación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos (LCC) en las instalaciones del Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) ubicado en Sabana Sur, San José, Costa Rica.

3.2 Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre por ICP-OES.

Se realizaron las pruebas analíticas y los ajustes de parámetros instrumentales necesarios para el desarrollo de una metodología técnicamente válida para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos mediante la técnica ICP-OES.

3.2.1 Preparación de la muestra enriquecida para el desarrollo de la metodología de análisis de azufre por ICP-OES.

Para la preparación de las muestras se tomó como referencia el método oficial AOAC 2017.02 (2019), el cual se refiere a la determinación de arsénico, cadmio, calcio, cromo, cobalto, cobre, hierro, plomo, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc en fertilizantes, sin embargo, se realizaron variaciones al mismo.

Inicialmente se preparó una disolución madre de 1000 mg/L de azufre a partir de un estándar de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) marca *Sigma Aldrich* certificado al 99,999 % de pureza. Se pesó 0,4118 g del estándar en una balanza analítica *Mettler Toledo XPE205* y se disolvió en un balón de 100,00 mL con agua acidificada con ácido nítrico al 1 %.

A partir de la disolución madre de 1000 mg/L se preparó una curva de calibración de azufre de seis disoluciones patrón, en un rango de concentración de 3,00 mg/L a 50,0 mg/L, como se muestra en el Cuadro 15.

Para la digestión ácida de las muestras, se pesó por duplicado 0,5000 g de la muestra en balanza analítica *Mettler Toledo XPE205* y se transfirieron a tubos de

digestión de politetrafluoroetileno (PTFE). Las muestras se enriquecieron a una concentración de 20,0 mg/L a partir de la disolución madre de 1000 mg/L de azufre.

Posteriormente, se le añadió 9,00 mL de ácido nítrico al 65 % grado reactivo marca *Merck KGaA*, se dejaron en reposo por 20 minutos y se le añadieron 3,00 mL de ácido clorhídrico entre 36,5 % y 38,0 % grado reactivo marca *J.T. Baker*, la adición de los ácidos se realizó en una capilla extractora de gases Flores Valles VA150960ACG+M. Luego, las muestras se dejaron en reposo toda la noche y al siguiente día se procedió con la digestión en un digestor de microondas *Berghof Speedwave* según la rampa de temperatura detallada en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Rampa de temperatura para la digestión por microondas de las muestras enriquecidas para el desarrollo de la metodología de análisis de azufre por ICP-OES.

Temperatura (°C)	Rampa (minutos) para alcanzar la temperatura	Tiempo (minutos) al que se mantiene la temperatura
200	15	20
50	20	5

Fuente: Elaboración propia.

Se procedió a transferir cuantitativamente las muestras a balones aforados de 50,00 mL. Se enjuagó cada tubo de digestión tres veces, con agua desionizada 18,0 MΩ. Luego, se transfirieron a tubos de centrifuga de polipropileno. Seguidamente se realizaron diluciones con micropipetas automáticas marca *Thermo Scientific* y *Eppendorf* y balones aforados, de manera que la concentración final se encontrara dentro de la curva de calibración. Por último, se analizó la curva de calibración y las muestras enriquecidas en un ICP-OES *Agilent Technologies* 5110 SVDV.

Posteriormente, se incorporó el uso de una solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio; para la cual se pesaron 8,000 g de cloruro de cesio (CsCl) marca *Sigma Aldrich* certificado al 99,995 % de pureza en un balón aforado de 1000 mL previamente lavado con ácido nítrico al 10 %. Se agregaron 3,00 mL de una solución estándar de Escandio, marca *Sigma Aldrich* con certificado de 998 ± 5 mg/L y 3,00 mL de una solución estándar de Berilio marca *Sigma Aldrich*, con certificado de 991 ± 6 mg/L. Después, se agregó 1,00 mL de Tritón X100 al 0,5 %, se diluyó con agua ultrapura. Esta solución se almacenó en un recipiente de polipropileno y se colocó en el sistema de válvula del instrumento.

Por último, se realizó una prueba para evaluar la masa de la muestra. Se pesaron dos muestras con 0,5000 g y 1,000 g respectivamente, ambas se enriquecieron con 20,0 mg/L de azufre y se analizaron en el ICP-OES.

3.2.2 Parámetros instrumentales de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

Para el desarrollo del método se realizaron pruebas a dos longitudes de onda: 180,669 nm y a 181,972 nm (Oliveira, *et al.* 2016 y CIA, 2019). Además, cabe mencionar que el *software* del instrumento *ICP-OES expert software*, versión 7.3.1 9507, también sugirió estas longitudes de onda para el análisis de azufre como las de mayor intensidad y las que presentan menos interferencias espectrales por parte de otros elementos comúnmente contenidos en los fertilizantes.

Cada longitud de onda se evaluó en dos configuraciones de vista del plasma: axial y radial. Además, se aumentó el tiempo de lavado del automuestreador SPS4 a 10 segundos. Cabe resaltar que en todos los análisis se realizó la purga del sistema óptico, con el fin de mejorar la precisión del método. Las condiciones instrumentales de operación se especifican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones instrumentales de operación del ICP-OES para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos.

Parámetro	Condición
Potencia del plasma (W)	1200
Flujo del gas de plasma (L/min)	12,00
Flujo del gas auxiliar (L/min)	1,00
Flujo del nebulizador (L/min)	0,70
Presión del gas del nebulizador (kPa)	315,50
Velocidad de bomba peristáltica (rpm)	12,00
Altura de visualización (mm)	8,00
Purga del sistema óptico	Sí

Fuente: elaboración propia.

3.3 Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

La validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES se llevó a cabo según la guía de validación de métodos (ECA-MC-PO01-G01) del ECA (2014a) para métodos no normalizados o desarrollados por el laboratorio que determinen componentes mayoritarios. Asimismo, para los criterios de aceptación de estos parámetros se tomó en cuenta lo establecido en las directrices para los requisitos de rendimiento del método estándar del ECA (2012) y la AOAC (2019). Estos parámetros se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Parámetros de desempeño por evaluar para la validación del método de análisis de azufre por ICP-OES y sus respectivos criterios de aceptación.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación		
	Concentración ≤ 1 % azufre	Concentración $1 < X \leq 10$ % azufre	Concentración $10 < X \leq 100$ % azufre
Selectividad	$t \text{ crítica} \geq t \text{ calculada}^*$		
Linealidad e intervalo de trabajo	$r \geq 0,995^*$		
Límite de detección	$\leq 0,17\%^{**}$		
Límite de cuantificación	$\leq 0,50\%^{**}$		
Veracidad (Recuperación)	$98\% \leq X \leq 102\%^{***}$		
Robustez	$(X-x) < \sqrt{2} S^*$		
Repetibilidad	$\% CV \leq 2,7^{***}$	$\% CV \leq 1,9^{***}$	$\% CV \leq 1,3^{***}$
Precisión intermedia	$\% CV \leq 4,00^{***}$	$\% CV \leq 3,00^{***}$	$\% CV \leq 2,00^{***}$
% Uexp	$\leq 4\%^{***}$	$\leq 3\%^{***}$	$\leq 2\%^{***}$

Nota: % Uexp: Porcentaje de incertidumbre expandida. Fuente: elaboración propia según: *ECA (2012); ** RTCR 485:2016 (2016) y ***AOAC (2019).

Se procedió a evaluar cada uno de los parámetros de desempeño indicados en el Cuadro 3, de acuerdo, como se detalla en el Anexo B.

3.4 Análisis del contenido de azufre en muestras de fertilizantes inorgánicos.

Una vez desarrollada y validada la metodología para cuantificar azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica ICP-OES, se procedió con la determinación del contenido de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos que ingresaron al LCC en los meses de mayo y junio del 2020, por el método de ICP-OES y por el método oficial AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.

Las muestras para la determinación del contenido de azufre fueron recolectadas por la Unidad de Fiscalización de Agroquímicos del SFE. Esto debido a que el Decreto Ejecutivo N° 36801-MAG (Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Fitosanitario del Estado, 2011) define como responsable de realizar el muestreo para el control de calidad de agroquímicos en fábricas y formuladoras a esta unidad. El muestreo se realizó en empresas formuladoras, emparadoras y comercios del país, con base en el plan anual de muestreo de agroquímicos realizado en los primeros meses de cada año. Asimismo, el Reglamento Técnico 176:1991 (1991). (Agroquímicos, toma de muestra) define la manera de realizar el muestreo.

En Costa Rica, la producción de fertilizantes azufrados es constante durante todo el año (D. Barker, comunicación personal, 11 de octubre de 2019), Unidad de Fiscalización de Agroquímicos del SFE). Sin embargo, se realizó el análisis de 14 muestras ingresadas al laboratorio durante los meses de mayo y junio del 2020. Se seleccionaron estos meses con base en datos del LCC de los últimos tres años, los cuales indicaron que, durante estos meses, el laboratorio recibe una mayor cantidad de fertilizantes para su control de calidad con respecto a los demás meses del año.

Cuando la Unidad de Fiscalización tuvo bajo su custodia las muestras, estas fueron entregadas al personal responsable del LCC, el cual se basó en el procedimiento de recepción, custodia y manejo de muestras (LAB-LCC-PO-07) para su ingreso al laboratorio. Una vez que se aprobó el estado de las muestras y de la solicitud de análisis, el responsable de la recepción las etiquetó con el código interno del laboratorio y las ubicó en un estante destinado al almacenamiento de muestras de fertilizantes. Las muestras fueron analizadas por duplicado al día siguiente.

Los resultados del análisis de contenido de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos ingresadas en los meses de mayo y junio del 2020 al LCC, se confrontaron con las tolerancias permitidas para los fertilizantes inorgánicos definidas en RTCR 485:2016 (2016) para estudiar su cumplimiento con el reglamento técnico.

3.5 Comparación de los resultados de azufre obtenidos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.

Se realizó una comparación de los resultados de contenido de azufre obtenidos por dos metodologías de análisis: la metodología desarrollada y validada por la técnica de ICP-OES y la metodología oficial de análisis de azufre total en fertilizantes por combustión AOAC 2017.08 que se aplica actualmente en el LCC (Anexo D). Para llevar a cabo la comparación, se utilizaron los resultados de 14 muestras de fertilizantes inorgánicos analizadas, como se indicó en el apartado anterior. Además, con estos datos se realizó un análisis estadístico, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los resultados de azufre arrojados por los dos métodos de análisis.

Para esto se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Esta técnica estadística se aplica para comparaciones en donde intervienen dos medias o más, por ejemplo, la comparación de los resultados obtenidos de la concentración de un analito utilizando diferentes métodos, en donde existen dos posibles fuentes de variación (Miller & Miller, 2002). Al utilizar el ANOVA se logró determinar si las variaciones de las medias son originadas por el método o por la muestra; debido a que el análisis de varianza representa una herramienta poderosa para separar y estimar las diferentes fuentes de variación (Miller & Miller, 2002; Hines & Montgomery, 1996).

Capítulo 4. Resultados.

4.1 Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

Para el desarrollo de la metodología se llevaron a cabo pruebas analíticas y ajustes de parámetros instrumentales, con el fin de encontrar las condiciones óptimas para el análisis de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica ICP-OES.

Las pruebas realizadas inicialmente a dos posibles configuraciones de vista del plasma: axial y radial; a partir de dos longitudes de onda: 180,669 nm y 181, 972 nm respectivamente, dieron como resultado porcentajes de recuperación inaceptables. Con la vista del plasma de manera axial se obtuvieron porcentajes de recuperación de 83,5 %, mientras que, con la vista del plasma de manera radial, se alcanzaron porcentajes de recuperación superiores a 102 %. Estos resultados se encontraron fuera del criterio de aceptación definido por la AOAC (2019) de mínimo 98 % y máximo 102 %, los mismos se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados iniciales del porcentaje de recuperación de azufre a dos configuraciones de vista del plasma (axial y radial) y a dos longitudes de onda (180,669 nm y 181, 972 nm), por la técnica ICP-OES.

Configuración de vista del plasma	Longitud de onda (nm)	Porcentaje de recuperación de muestra enriquecida (%)
Radial	180,669	109
	181,972	117
Axial	180,669	83,3
	181,972	83,5

Fuente: Elaboración propia.

Para solucionar esta imprecisión, se incorporó una solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio; con el fin de corregir las posibles

interferencias de ionización. Además, se aumentó el tiempo de lavado del automuestreador a 10 segundos para mejorar la repetibilidad de los resultados. De esta manera, se logró obtener un porcentaje de recuperación adecuado de 99,5 %, específicamente con la vista radial leída a la longitud de onda de 181,972 nm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de porcentaje de recuperación de azufre con la incorporación de la solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio y con 10 segundos de lavado del automuestreador, por la técnica ICP-OES.

Configuración de vista del plasma	Longitud de onda (nm)	Porcentaje de recuperación de muestra enriquecida (%)
Radial	180,669	94,4
	181,972	99,5
Axial	180,669	92,3
	181,972	93,1

Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, se estudiaron los espectros de emisión de la configuración de vista del plasma axial y radial (Figura 5 y Figura 6, respectivamente). Al observar las intensidades del eje Y, se resalta la señal más intensa de hasta 5500 en la configuración de vista axial, sin embargo, los porcentajes de recuperación a esta vista no fueron adecuados, ya que fueron menores al criterio de aceptación de 98 % definido por la AOAC (2019) (Cuadro 5).

Por otro lado, la configuración de vista del plasma de forma radial a la longitud de onda de 181,972 nm (Figura 6 B) dio como resultado señales más intensas de azufre de hasta 1100 y se obtuvo una recuperación adecuada de 99,5 %, en contraste con la longitud de onda de 180,669 nm que presentó intensidades más bajas de apenas 400 (Figura 6 A) y porcentajes de recuperación menores a lo establecido como criterio de aceptación (Cuadro 5). Por lo tanto, se definió la configuración de vista del plasma de manera radial a una longitud de onda de 181,972 nm como las condiciones óptimas para el análisis de azufre en fertilizantes.

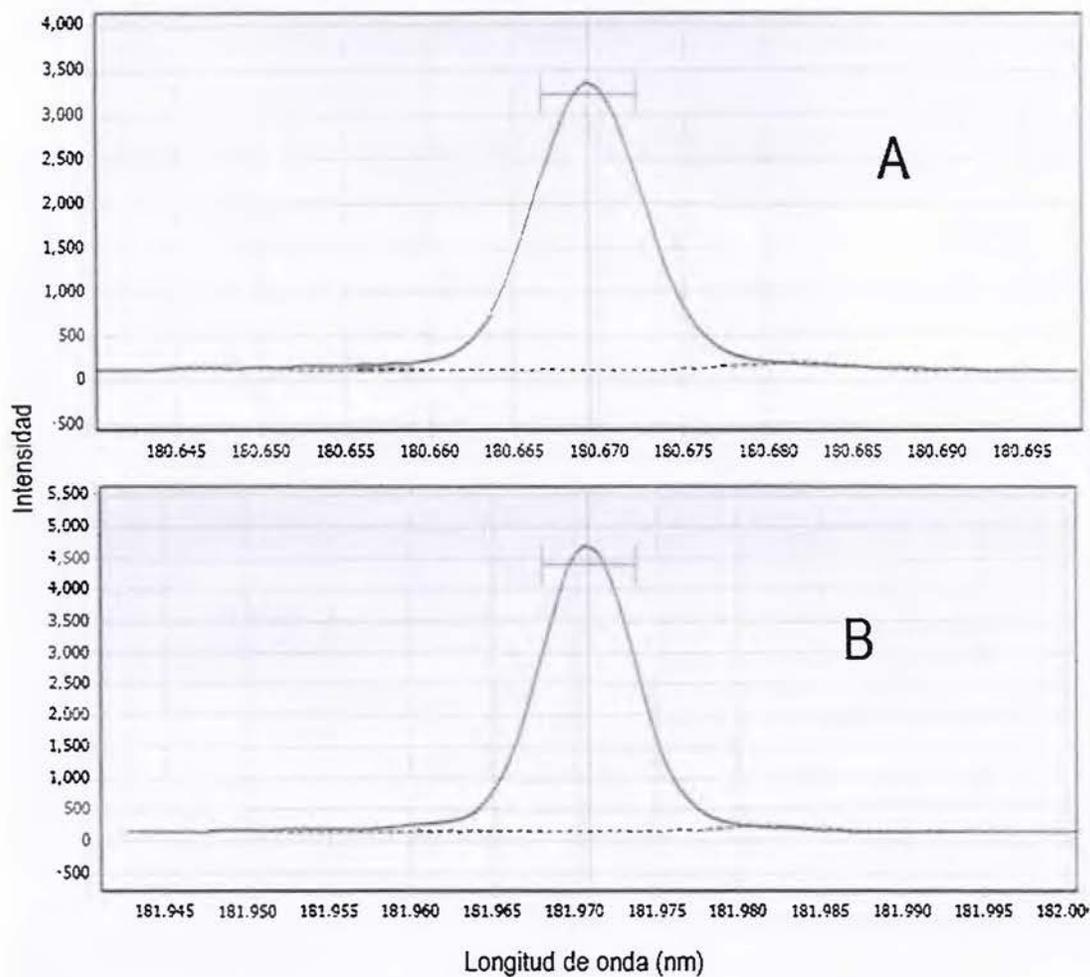


Figura 5. Espectro de emisión obtenido generalmente por la muestra de fertilizante enriquecida a 20,0 mg/L de azufre, visualizada en configuración axial y leídas a 180,669 nm (A) y 181,972 nm (B) respectivamente, por la técnica ICP-OES. Fuente: Elaboración propia a partir del *ICP-OES expert software*, versión 7.3.1 9507.

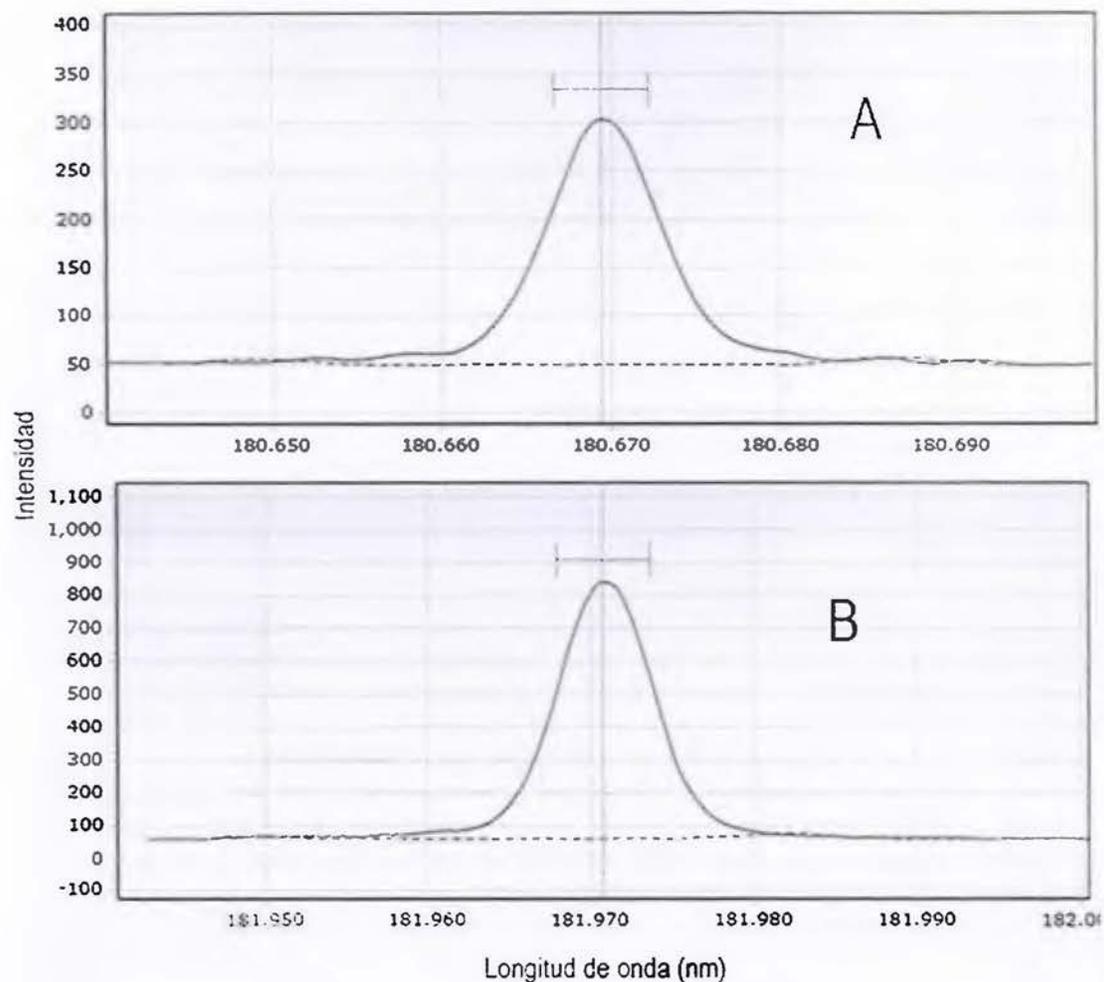


Figura 6. Espectro de emisión obtenido generalmente por la muestra de fertilizante enriquecida a 20,0 mg/L de azufre, visualizada en configuración radial y leídas a 180,669 nm (A) y 181,972 nm (B) respectivamente, por la técnica ICP-OES. Fuente: Elaboración propia a partir del *ICP-OES expert software*, versión 7.3.1 9507.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de las masas de la muestra se aprecian en el Cuadro 6. Ambos resultados de recuperación se encontraron dentro del criterio de aceptación definido por la AOAC (2019). Sin embargo, la masa de 0,5000 g de muestra, resultó más conveniente para el laboratorio en cuanto a productividad y disminución de residuos. Por lo tanto, se definió esta masa de muestra para la metodología desarrollada para el análisis de azufre por ICP-OES.

Cuadro 6. Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de las dos masas de muestra para el análisis de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

Masa (g)	Porcentaje de recuperación de muestra enriquecida (%)
1,000	102
0,5000	101

Fuente: Elaboración propia.

4.2 Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

4.2.1 Linealidad e intervalo de trabajo.

En la Figura 7 A se observa la curva de calibración obtenida y su respectivo coeficiente de correlación (r), conforme con el criterio de aceptación de $r \geq 0,995$. Se demostró un comportamiento lineal, que indica que los resultados de intensidad son proporcionales a las concentraciones de azufre en el rango específico de 3,00 mg/L a 50,0 mg/L.

Asimismo, se examinaron los residuos de la regresión lineal (Figura 7 B), los cuales demostraron carencia de sesgo ya que se encuentran distribuidos aleatoriamente y no presentaron tendencias indeseables.

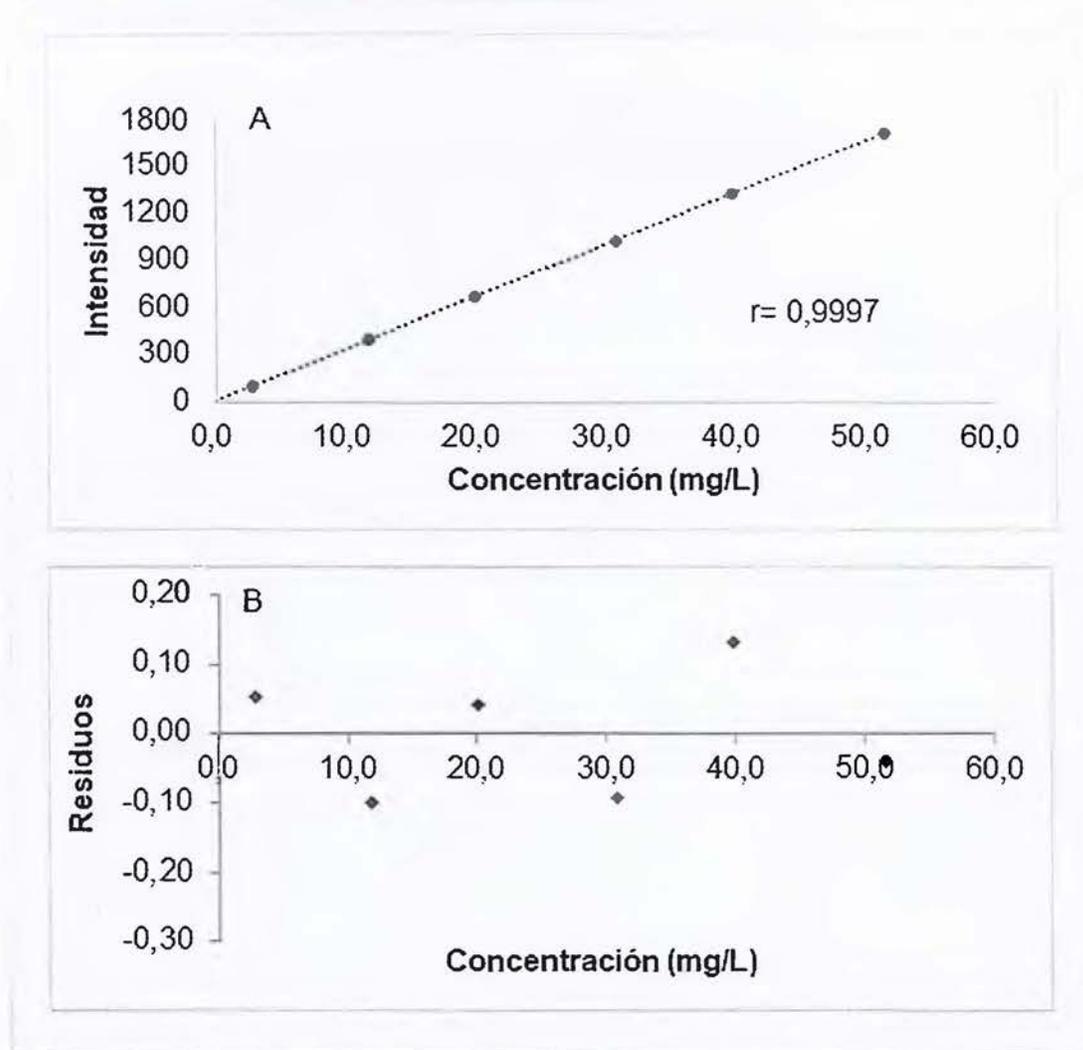


Figura 7. Resultados de la curva de calibración de azufre (A) y residuos de la regresión lineal (B) obtenidos mediante el método ICP-OES. Fuente: Elaboración propia.

4.2.2 Selectividad.

La prueba t realizada para la evaluación de la selectividad, demostró que no existe diferencia significativa entre la respuesta del blanco reactivo y la del blanco matriz, debido a que la t calculada fue menor a la t crítica predefinida para seis datos a un nivel de confianza del 95 % (Cuadro 7). Además, se obtuvo un coeficiente de selectividad cercano a cero, lo cual confirma que la metodología es selectiva.

Cuadro 7. Prueba *t* para la evaluación de la selectividad del método de análisis de azufre por ICP-OES.

t crítica para 6 datos con nivel de confianza 95 %	t calculada	Coefficiente de selectividad	Criterio de aceptación
2,015	0,0458	0,000166	$t \text{ crítica} \geq t \text{ calculada}$

Fuente: Elaboración propia.

4.2.3 Límite de detección y cuantificación.

De acuerdo con lo establecido por el ECA (2012), si se conoce de antemano la concentración de analito en la muestra, los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) deben ser menores a la cantidad que se requiere cuantificar. Por esta razón, se tomó como criterio de aceptación para el LQ el porcentaje mínimo de contenido de azufre declarado en el reglamento técnico RTCR 485:2016 (2016), el cual corresponde a 0,50 %, y con base en este, se calculó el criterio para el LD.

Mediante la evaluación del LQ y el LD se obtuvieron los resultados detallados en el Cuadro 8. Como se puede observar, los mismos cumplen con el criterio de aceptación definido.

Cuadro 8. Resultados de límite de cuantificación y detección del método de análisis de azufre por ICP-OES.

Parámetro de desempeño	Resultado (%)	Criterio de aceptación (%)
Límite cuantificación (LQ)	0,00371	$\leq 0,50$
Límite detección (LD)	0,00187	$\leq 0,17$

Fuente: Elaboración propia.

4.2.4 Veracidad.

En la evaluación de la veracidad se obtuvieron porcentajes de recuperación de las muestras enriquecidas dentro del criterio de aceptación de mínimo 98 % y máximo 102 % definido por la AOAC (2019); a los tres niveles de concentración de azufre evaluados: 3,00 mg/L, 20,0 mg/L y 40,0 mg/L (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados para la evaluación de la veracidad del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.

Nivel de concentración (mg/L)	Porcentaje de recuperación promedio para n=7 (%)	Criterio de aceptación (%)
3,00	100	
20,0	99,9	98-102
40,0	99,7	

Fuente: Elaboración propia.

4.2.5 Repetibilidad.

La repetibilidad demostró coeficientes de variación (CV) significativamente menores al criterio de aceptación definido por la AOAC (2019), para los tres niveles de concentración de azufre evaluados. Por consiguiente, se afirma la repetibilidad del método de acuerdo con los resultados observados en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados para la evaluación de la repetibilidad del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.

Nivel de concentración (%)	Concentración de azufre promedio para n=7 (%)	Desviación estándar	CV	Criterio de aceptación (CV)
≤ 1	0,723	0,00677	0,937	≤ 2,7
1 < X ≤ 10	4,40	0,0421	0,956	≤ 1,9
10 < X ≤ 100	24,4	0,252	1,03	≤ 1,3

Fuente: Elaboración propia.

4.2.6 Precisión intermedia.

La precisión intermedia evaluada en siete días diferentes con muestras enriquecidas a tres niveles de concentración de azufre, demostró coeficientes de variación (CV) sustancialmente menores al criterio de aceptación definido por la AOAC (2019). Los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados para la evaluación de la precisión intermedia del método de análisis de azufre por ICP-OES, en tres niveles de concentración.

Nivel de concentración (mg/L)	Concentración azufre promedio para n=7 (mg/L)	Desviación estándar	CV	Criterio aceptación (CV)
3,00	3,02	0,000242	0,810	≤ 4,00
20,0	20,0	0,00293	1,48	≤ 3,00
40,0	39,9	0,00451	1,14	≤ 2,00

Fuente: Elaboración propia.

De esta manera, los resultados adecuados de repetibilidad y de precisión intermedia con respecto a sus criterios de aceptación, confirman la precisión del método para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos por ICP-OES.

4.2.7 Robustez.

Para la evaluación de la robustez se utilizó la combinación factorial de las condiciones del método especificadas en el Cuadro 16 del Anexo B, la cual se basó en el test de Youden y Steiner para métodos analíticos. Se planteó la siguiente hipótesis para las siete condiciones del método evaluadas:

- Hipótesis nula (H_0): $\mu_1 = \mu_2$: No existe diferencia significativa entre la condición original y la condición variable del método.
- Hipótesis alternativa (H_a): $\mu_1 \neq \mu_2$: Existe diferencia significativa entre la condición original y la condición variable del método.

Los resultados del Cuadro 12 demuestran que las diferencias del promedio de los resultados bajo las condiciones originales del método (X) y el promedio de los resultados bajo las condiciones alteradas del método (x), fueron menores al máximo permitido ($\sqrt{2} * S$). Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, la cual afirma que el método es robusto ante pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo.

Cuadro 12. Resultados del porcentaje de azufre promedio obtenido bajo las condiciones originales del método (X) y las condiciones alteradas del método (x), para la evaluación de la robustez del método de análisis de azufre por ICP-OES. La desviación estándar (S) de los datos fue de 0,00139.

Promedio X (%)	Promedio x (%)	Diferencia (X-x)	Máximo permitido	Hipótesis nula
0,202	0,202	-0,000824		Aceptada
0,202	0,203	-0,000990		Aceptada
0,202	0,202	-0,000501		Aceptada
0,202	0,202	0,000765	0,00196	Aceptada
0,203	0,201	0,00162		Aceptada
0,202	0,203	-0,000863		Aceptada
0,202	0,202	-0,000577		Aceptada

Fuente: Elaboración propia.

4.2.8 Incertidumbre.

El cálculo de la incertidumbre se realizó según lo establecido en la política de incertidumbre de las mediciones ECA-MC-PO02 del ECA (2014c). Se definió la Ecuación 2 para el cálculo de la concentración de azufre como se detalla a continuación:

$$\% m/v = \frac{C_e * V_b * FD * (\rho - E\rho) * 100}{(m * Erm) * 1000 * 1000} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

% m/v: Porcentaje masa – volumen.

C_e: concentración de la muestra dada por el *ICP-OES expert software*.

V_b: Volumen del balón de dilución de la muestra.

FD: Factor de dilución.

ρ: Densidad de la muestra.

E_ρ: Error relativo de la medida de densidad.

m: Masa de la muestra.

E_m: Error relativo a la masa de la muestra.

Posteriormente se identificaron los factores contribuyentes a la incertidumbre mediante un diagrama de causa y efecto (Figura 8).

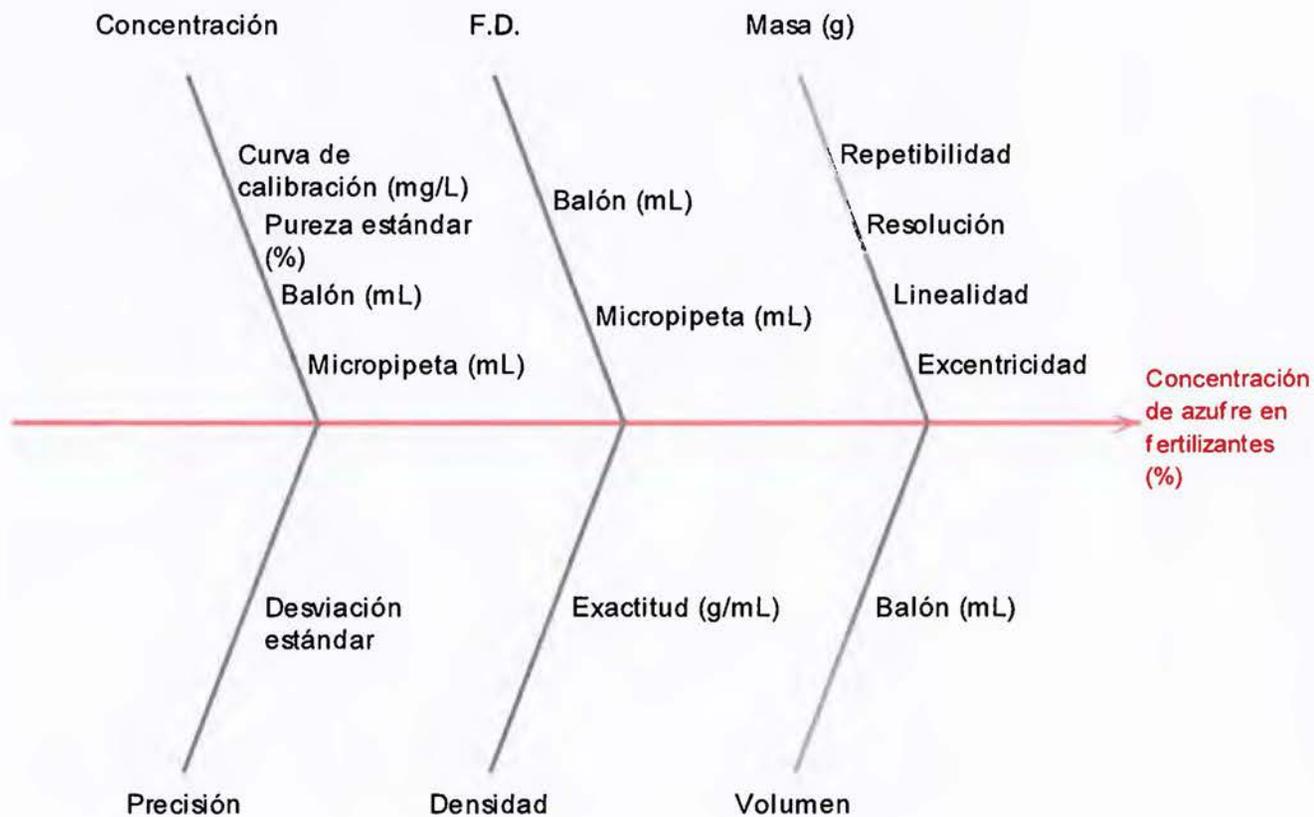


Figura 8. Diagrama de causa y efecto para la concentración de azufre obtenida mediante el método de ICP-OES.

Fuente: Elaboración propia a partir de *Minitab® Statistical Software*, versión 18.1, 2017.

Para el cálculo de la incertidumbre combinada y expandida se siguió el procedimiento indicado en el Anexo C. De manera que el resultado de la concentración final de azufre en una muestra de fertilizante inorgánico es igual a:

$$(12,04 \pm 0,23) \% \text{ m/m}$$

Donde 0,23 % corresponde a la incertidumbre expandida a un 95 % de confianza y con un factor de cobertura (k) igual a dos.

La AOAC (2019) define el criterio de aceptación de la incertidumbre en función del nivel de concentración del analito. De manera que, para una concentración de 12,04 % de azufre, la incertidumbre debe ser máximo un 2,75 % del resultado de medición. La incertidumbre obtenida corresponde a un 1,91 % del resultado de azufre obtenido, por lo tanto, este parámetro cumple con lo recomendado.

4.3 Análisis del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.

Se determinó el contenido de azufre en 14 muestras de fertilizantes inorgánicos por dos metodologías de análisis: ICP-OES y combustión AOAC 2017.08. El contenido de azufre obtenido para cada una de ellas corresponde al valor medio calculado a partir de dos determinaciones con sus respectivas incertidumbres (Cuadro 13).

Cuadro 13. Concentración de azufre obtenida por los métodos analíticos ICP-OES y combustión AOAC 2017.08 en 14 muestras de fertilizantes inorgánicos, con su respectiva incertidumbre expandida y el resultado de cumplimiento con el RTCR 485:2016 de acuerdo con la concentración declarada.

Muestra	Método de ICP-OES	Método de combustión	Cumplimiento con RTCR 485:2016
	% azufre promedio (n=2)	% azufre promedio (n=2)	
1	11,29 ± 0,42	11,96 ± 0, 17	Cumple
2	3,68 ± 0,10	3,685 ± 0, 015	Cumple
3	6,13 ± 0,40	6,7115 ± 0,0027	Cumple
4	2,184 ± 0,086	2,24 ± 0,23	Cumple
5	5,06 ± 0,15	5,01 ± 0,20	Cumple
6	1,50 ± 0,11	1,49 ± 0,20	No cumple
7	3,48 ± 0,10	2,90 ± 0,18	Cumple
8	2,812 ± 0,081	2,39 ± 0,22	Cumple

Muestra	Método de ICP-OES	Método de combustión	Cumplimiento con RTCR 485:2016
	% azufre promedio (n=2)	% azufre promedio (n=2)	
9	10,25 ± 0,46	10,51 ± 0,23	Cumple
10	1,164 ± 0,050	1,03 ± 0,17	Cumple
11	13,04 ± 0,23	13,59 ± 0,35	Cumple
12	10,42 ± 0,44	9,65 ± 0,21	Cumple
13	2,73 ± 0,10	2,82 ± 0,18	Cumple
14	9,29 ± 0,27	9,15 ± 0,27	Cumple

Fuente: Elaboración propia.

En los resultados del Cuadro 13 se observa cómo, una de las muestras no cumplió con las tolerancias permitidas por el RTCR 485:2016 para la concentración de azufre, lo que representa un 7,14 % del total de muestras analizadas. Mientras que 13 muestras sí cumplieron con el reglamento, para un 92,9 %.

Posteriormente, se dio tratamiento a los datos del Cuadro 13 con *Minitab® Statistical Software* (2017) para realizar el análisis de varianza (ANOVA), con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los resultados de contenido de azufre para los factores. El primer factor corresponde a las muestras con diferente contenido de azufre que se analizaron; el segundo factor se refiere a las dos metodologías de análisis de azufre: la metodología desarrollada y validada por ICP-OES y la metodología oficial de análisis azufre por combustión AOAC 2017.08.

Un resultado esperado fue que la variación en la concentración de azufre obtenida estuviera dada principalmente por el factor muestra, ya que se partió de la premisa de que las muestras que ingresaran al LCC para ser analizadas iban a reportar una concentración de azufre diferente, lo anterior se evidencia en el Cuadro 13, en donde se confirma que las 14 muestras analizadas presentaron una concentración de azufre distinta. Con el ANOVA se logra separar y estimar las diferentes fuentes de variación en el experimento, de esta manera, se logró determinar la variación de la concentración de azufre debida al factor método, es decir, permitió determinar si los dos métodos realizan mediciones semejantes de la concentración de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos ingresadas al LCC. Por lo tanto, se resalta que el factor de interés en el análisis de varianza realizado en la presente investigación fue el factor método, para esto, se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): $\mu_1 = \mu_2$: No existe diferencia significativa entre los resultados del contenido de azufre obtenidos mediante el método de ICP-OES y el método de combustión.
- Hipótesis alternativa (H_a): $\mu_1 \neq \mu_2$: Existe diferencia significativa entre los resultados del contenido de azufre obtenidos mediante el método de ICP-OES y el método de combustión.

A partir del análisis de varianza, se obtuvieron los datos mostrados en el Cuadro 14. En este cuadro se puede observar que el valor de significancia (p) para el factor "método" fue de 0,833, el cual es considerablemente mayor que la significancia predefinida para el experimento ($\alpha = 0,05$). Por lo tanto, existe suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis nula, y se concluye con un 95 % de confiabilidad que no existe diferencia significativa entre los resultados de contenido de azufre obtenidos mediante los dos métodos de análisis de azufre comparados.

Cuadro 14. Análisis de varianza para la comparación de dos métodos de análisis de azufre en fertilizantes: ICP-OES y combustión AOAC 2017.08.

Fuente	Grados de libertad	Sumas secuenciales ajustadas	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Muestra	13	903,479	69,4983	6687,63	0,000
Método	1	0,000	0,0005	0,05	0,833
Muestra* Método	13	2,322	0,1786	17,19	0,000
Error	28	0,291	0,0104		
Total	55	906,092			

Fuente: Elaboración propia a partir de *Minitab® Statistical Software*, versión 18.1, 2017.

Otro aspecto que se debe destacar del Cuadro 14, es que los valores de significancia para el factor “muestra” y para la interacción (Muestra*método) fueron menores al $\alpha=0,05$; es decir, las diferencias del factor muestra fueron significativas, como era esperado.

Para demostrar la validez del análisis de varianza se estudiaron los supuestos del modelo: normalidad, varianza constante, e independencia (Figura 9). Para la prueba de normalidad se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Los datos siguen una distribución normal.
- Hipótesis alternativa (H_a): Los datos no siguen una distribución normal.

En la Figura 9 A, se observa que el valor de significancia (p) de la prueba de normalidad fue de 0,374. Este valor es mayor que la significancia predefinida ($\alpha=0,05$), lo que permite aceptar la hipótesis nula y confirmar que los residuos se ajustan a la distribución normal. Se observa también cómo los puntos se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo de la línea de mejor ajuste y el histograma presenta una distribución gaussiana (Figura 9 C).

Por su parte, la Figura 9 D demuestra la independencia en el análisis, ya que los datos se ubican aleatoriamente alrededor de la línea central y no evidencian

tendencias ni patrones, lo que confirma que los datos fueron recolectados de manera aleatoria, para cada factor.

Con respecto a la Figura 9 B, se observaron datos con una varianza relativamente mayor. Sin embargo, este comportamiento se atribuye a las diferentes concentraciones de azufre en las muestras analizadas. Por lo tanto, con este análisis se concluye que los supuestos del modelo se cumplen adecuadamente y se confirma la validez del ANOVA realizado.

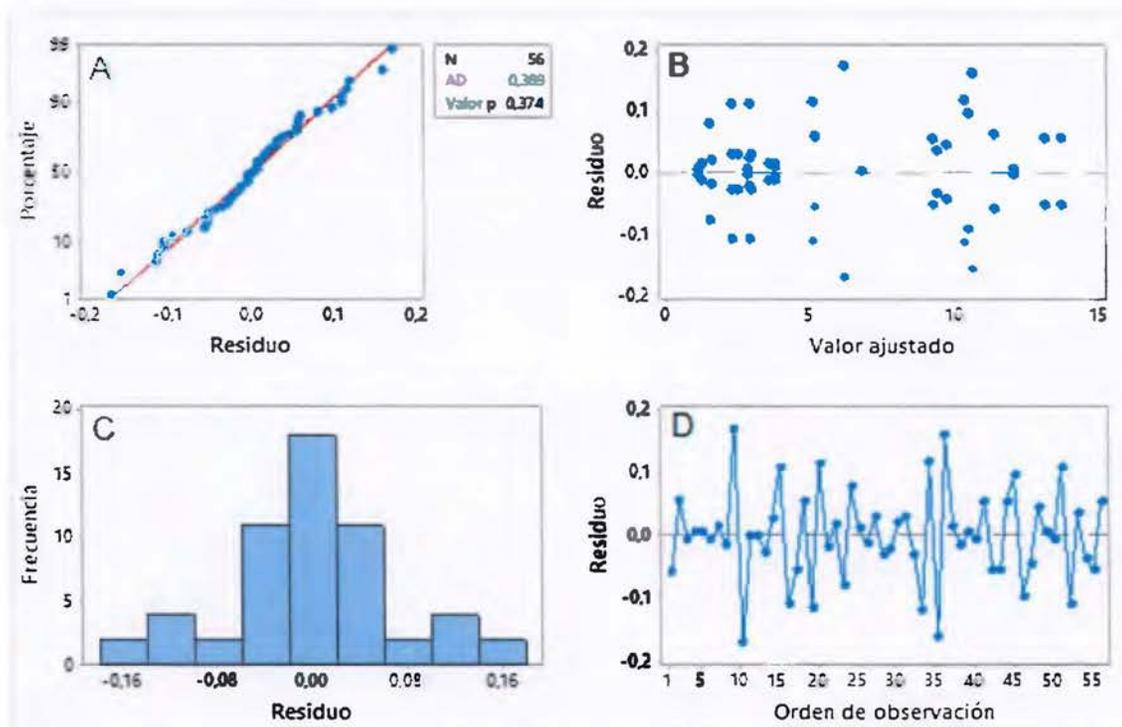


Figura 9. Residuos del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de los supuestos del modelo. Fuente: Elaboración propia a partir de Minitab® *Statistical Software*, versión 18.1, 2017.

Capítulo 5. Discusión de resultados.

5.1 Desarrollo de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

En las pruebas realizadas inicialmente con la vista del plasma de manera axial y radial, se obtuvieron porcentajes de recuperación inaceptables (Cuadro 4), ya que de acuerdo con la AOAC (2019) la medida de recuperación debe ser de mínimo 98 % y máximo 102 %.

En ICP-OES las interferencias son dependientes de la matriz de la muestra y del elemento de interés (Huamán, 2017). Una interferencia común por parte de la matriz es la interferencia de ionización, debida a la presencia de elementos fácilmente ionizables (EIE's, por sus siglas en inglés) como potasio, sodio, calcio y magnesio (Castañeda, 2010; Rosero, 2017). De acuerdo con Abad (2018), las bajas energías de ionización de estos elementos generan un incremento en la densidad de electrones dentro del plasma, a un nivel donde se ve afectado el equilibrio atomización-ionización de otros elementos, lo que genera un aumento o disminución de la intensidad de la señal de emisión por parte del elemento que se desea cuantificar.

Los resultados de recuperación de azufre del Cuadro 4, considerados inaceptables con respecto al criterio de aceptación definido por la AOAC (2019), se atribuyen a la presencia de los elementos fácilmente ionizables, ya que de acuerdo con Santos (2010), estos por lo general se encuentran presentes en los fertilizantes. Para *Agilent Technologies*, (2012) el efecto positivo o negativo de estos elementos también es dependiente de la matriz y del elemento por analizar, sin embargo, las interferencias de ionización pueden corregirse mediante un estándar interno adecuado.

La AOAC (2019) recomienda una solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio, para el análisis de otros elementos en fertilizantes por ICP-OES. Harris (2018) coincide con lo anterior, y considera al cesio como un elemento supresor de ionización que puede reducir significativamente los efectos de las interferencias de ionización; además, considera que la intensidad de emisión

del cesio es muy débil en ICP-OES, por lo tanto, es poco probable que cause interferencia espectral en otros elementos.

Por otra parte, la poca repetibilidad de los resultados de recuperación de azufre, es un problema que puede atribuirse al sistema de introducción de la muestra (Vanclay, 2019). Por lo tanto, se aumentó el tiempo de lavado del automuestreador a 10 segundos y se cambiaron los tubos de la bomba peristáltica, con el fin de mejorar la repetibilidad de los resultados. De esta manera, la optimización con la solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio y el lavado del automuestreador por 10 segundos, permitieron obtener una recuperación conforme con la AOAC (2019) de 99,5 % y mejorar la repetibilidad de los resultados, específicamente en la configuración de vista radial y a la longitud de onda de 181,972 nm (Cuadro 5).

Asimismo, se estudiaron los espectros de emisión obtenidos en la configuración de vista del plasma de manera axial y radial, los cuales se pueden observar en la Figura 5 y Figura 6 respectivamente. Se evidencia una señal más intensa de hasta 5500 en la configuración axial, sin embargo, en el Cuadro 5 se puede detallar que la recuperación a esta vista es baja para las dos longitudes de onda observadas (92,3 % y 93,1 % respectivamente), en relación al criterio de aceptación.

Al respecto, Lagos (2016) confirma que la configuración axial tiene una mayor sensibilidad, sin embargo, también posee una mayor susceptibilidad a las interferencias provenientes de la matriz, mientras que la vista radial tiene una mayor tolerancia a altos sólidos disueltos y matrices complejas. Por esta razón se descartó el análisis mediante la configuración de vista del plasma de manera axial.

Agilent Technologies (2012) resalta que, para el análisis de matrices más complejas, se prefieren los sistemas radiales, ya que se deja la cola del plasma refrigerante fuera del alcance de la trayectoria óptica. La cual tiene un efecto de disminución del rendimiento analítico por la auto-absorción de los iones y de los átomos emisores, la reducción en el rango lineal, e intensificación de las interferencias debidas a la matriz.

Efectivamente, el resultado obtenido en el Cuadro 5 con la vista del plasma de manera radial fue satisfactorio. Por otro lado, si se observan los espectros de emisión de la Figura 6, la señal obtenida a la longitud de onda de 181,972 nm fue mayor, con intensidades de hasta 1100 con respecto a la de 180,669 nm que presentó intensidades más bajas de apenas 400.

Además, la longitud de onda de 181,972 nm presenta una mejor relación de señal-ruido; por lo cual, se definió la longitud de onda de 181,972 nm y la configuración de vista del plasma de forma radial, como las condiciones instrumentales óptimas para el análisis de azufre en fertilizantes. Estas condiciones concuerdan con el estudio de Oliveira, *et al.* (2016) para el análisis de azufre en fertilizantes en Brasil. Asimismo, en los estudios de Ulrich, *et al.* (2009) y Mketi, Nomngongo y Ngila (2014) se mencionan observaciones similares con respecto a la vista del plasma de manera radial, para el análisis de azufre en diferentes matrices como abetos y carbón.

Por otro lado, se incorporó la purga al sistema óptico, como lo recomienda Oliveira, *et al.* (2016), ya que debe realizarse cuando se desean cuantificar elementos con líneas de emisión por debajo de 190 nm, entre ellas el arsénico, azufre, fósforo y aluminio (Agilent Technologies, 2012). De manera que, se utiliza un contraflujo de argón que minimiza la intrusión de aire, el cual reduce la sensibilidad del análisis (Lagos, 2016).

Los resultados del Cuadro 6 permitieron definir la masa de la muestra de 0,5000 g debido a que resulta más conveniente para el laboratorio. Para el análisis de otros elementos que se cuantifican en la matriz de fertilizantes, la masa de la muestra es de 0,5000 g de acuerdo con el procedimiento AOAC 965.09 Nutrientes (Menores) en Fertilizantes: Método Espectrofotométrico de Absorción Atómica (2019). Con esto se mejora la productividad del laboratorio y se generan menos residuos. Rodríguez (2018) coincide con lo anterior, y recomienda esta cantidad de muestra para una digestión por microondas, la cual es suficiente para la determinación del elemento, inclusive a bajas concentraciones del mismo.

5.2 Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

Con respecto a la validación de la metodología desarrollada, se evaluó el cumplimiento de los parámetros de desempeño establecidos por el ECA (2014a), con sus respectivos criterios de aceptación definidos por el ECA (2012), el RTCR 485:2016 (2016) y la AOAC (2019).

Para el parámetro de linealidad e intervalo de trabajo, el ECA (2012) establece que la representación gráfica del rango de concentraciones del analito frente a la respuesta del sistema de medición debe mostrar una buena correlación en los puntos experimentales de la recta de regresión. Se obtuvo un coeficiente de correlación (r) conforme con el criterio de aceptación de $r \geq 0,995$ (Figura 7 A). Además, Calzadilla, Vidal y Borroto (2017) mencionan que un modelo lineal se ajusta correctamente a los datos, si las diferencias entre los valores observados y los valores de predicción del modelo (residuos) son pequeñas y no revelan patrones no deseados, que se traducen a errores sistemáticos en los resultados. En este estudio, la Figura 7 B demostró que los errores residuales son homocedásticos; es decir, los residuos se encuentran distribuidos aleatoriamente (Otero, 2019). En conclusión, se puede aseverar que la relación intensidad- concentración de azufre es lineal en todo el intervalo de trabajo de 3,00 mg/L a 50,0 mg/L.

Por otra parte, Sierra, Gómez, Pérez y Morante (2009) definen el coeficiente de selectividad como la medida de la sensibilidad de un método ante un interferente en comparación con su sensibilidad para el analito. De acuerdo con ECA (2012), se espera que la respuesta instrumental total se encuentre lo más cercana posible a la respuesta instrumental debida al analito. Es decir, que la respuesta instrumental debida a interferencias y la respuesta instrumental debida a reactivos y disolventes sea insignificante. Esto se consigue cuando el coeficiente de selectividad de la interferencia es tan pequeño que se aproxima a cero.

Los resultados del Cuadro 7 confirman la selectividad de la metodología, ya que el coeficiente de selectividad obtenido fue de 0,000166. Además, se encontró mediante una prueba t , que no existe diferencia significativa entre la respuesta

instrumental debida al blanco reactivo y al blanco matriz. Por lo tanto, se puede confiar en que el método por ICP-OES posee la habilidad de determinar específicamente el contenido de azufre en presencia de otros componentes de la matriz.

A pesar de que los límites de detección son considerablemente más altos cuando se observa el plasma de manera radial (Karadjov, *et al.* 2016), en el presente estudio ambos parámetros estuvieron por debajo de los criterios de aceptación (Cuadro 8), de manera que el método por ICP-OES es apto para la detección y cuantificación del contenido de azufre en los fertilizantes comercializados en el país.

En cuanto a la veracidad del método para la determinación de azufre por ICP-OES, el Cuadro 9 muestra cómo los porcentajes de recuperación se mantuvieron entre 98 % y 102 %, para los tres niveles de concentración evaluados; es decir, los resultados cumplen con el criterio de aceptación definido por la AOAC (2019). Por lo tanto, se puede afirmar que el método es capaz de cuantificar verazmente la cantidad de azufre presente en una muestra.

En referencia a la precisión del método para la determinación de azufre por ICP-OES, se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia. Los coeficientes de variación mostrados en el Cuadro 10 y Cuadro 11, se encontraron conformes con los máximos permitidos por la AOAC (2019) para los tres niveles de concentración evaluados, lo que demuestra que el método es preciso independientemente de la cantidad de réplicas o del día en el que se realice el análisis.

Por otra parte, los resultados del Cuadro 12 para la evaluación de la robustez del método por ICP-OES, demostraron que las condiciones alteradas del método no generaron una influencia significativa en el resultado final del azufre recuperado. Es decir, que pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo no afectan significativamente el resultado obtenido (Martins & De Oliveira, 2019).

El LCC, en su función de laboratorio oficial para el control de calidad de los agroquímicos comercializados en Costa Rica y de acuerdo con el RTCA (2016), debe referenciarse en la AOAC para definir sus incertidumbres de medición. A su

vez, la AOAC (2019) define el criterio de aceptación de la incertidumbre de acuerdo con el nivel de concentración del analito. En la presente investigación, el resultado de incertidumbre expandida obtenido representa un 1,91% del resultado de azufre reportado, este valor es menor al criterio de aceptación definido. Por lo tanto, el método para la determinación de azufre por ICP-OES cumple con lo establecido por la AOAC (2019) para la incertidumbre de la medición.

5.3 Análisis del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por los métodos ICP-OES y AOAC 2017.08 Azufre total por combustión.

En concordancia con Morales y Gago (2017) se considera el azufre como un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas y es requerido en cantidades similares a los macronutrientes primarios. Por lo tanto, se debe examinar el cumplimiento de las concentraciones de azufre de las muestras de fertilizantes inorgánicos analizadas, con respecto a las tolerancias permitidas por el RTCR 485:2016 (2016).

El reglamento en mención establece que los elementos presentes en los fertilizantes inorgánicos deben cumplir individualmente con las tolerancias establecidas en este, ya que los fertilizantes constituyen un importante factor en la competitividad del sector agropecuario. El análisis de azufre realizado mediante la metodología validada en las muestras de fertilizantes inorgánicos que ingresaron al LCC durante los meses de mayo y junio del 2020, demostró que el 92,9 % de las muestras analizadas cumplieron con las tolerancias establecidas en el RTCR 485:2016 (2016), lo que permite inferir que estos fertilizantes analizados se encuentran conformes con la concentración de azufre declarada.

Por otra parte, la comparación de las metodologías ICP-OES y AOAC 2017.08 para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos, se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos en el Cuadro 14 permitieron aceptar la hipótesis nula y concluir con un 95 % de confiabilidad que no existe diferencia significativa entre los resultados de contenido de azufre obtenidos mediante los dos métodos de análisis confrontados. En concordancia con Fernández, Pérez y Medina (2019) el criterio de rechazo de la hipótesis nula (H_0)

consistió en que el valor de significancia observada (p) fuera menor a la significancia predefinida de 5 % ($\alpha= 0,05$). Sin embargo, Martínez, Sánchez, Toledo y Faulin, (2020) mencionan que la validez de los resultados obtenidos en un análisis de varianza queda sujeta al cumplimiento de los supuestos del modelo: normalidad, varianza constante e independencia.

Los resultados de la Figura 9 A, mostraron que la significancia de la prueba de normalidad fue mayor a 0,05 y la organización de los datos se encontró en paralelo a la línea de distribución ajustada. Por lo tanto, se concuerda con Chambi (2019) y Martínez (2019) al afirmar que los residuos se ajustaron a la distribución normal. Con respecto a la independencia, los residuos de la Figura 9 D se ubicaron aleatoriamente alrededor de la línea central, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Domínguez y Castaño (2010) y Gutiérrez y De la Vara (2012). Además, el orden cronológico de los residuos no evidencia tendencias ni patrones, esto demuestra que los resultados fueron recolectados de manera aleatoria para cada factor, es decir, que dentro de cada factor (muestra y método) la respuesta de porcentaje de azufre es independiente de las demás (Fernández, 2019).

La Figura 9 B muestra cómo la varianza de los residuos aumentó relativamente con los valores ajustados. Al respecto, Sandoval y Rivera (2019) declaran un incumplimiento del supuesto de varianza constante. Sin embargo, Gutiérrez y de la Vara (2012), son enfáticos en que se debe entender el proceso con el cual se experimenta y estudiar en qué sentido se afectan las conclusiones del ANOVA, ya que varios autores aseguran que el ANOVA es robusto ante violaciones moderadas del supuesto de homogeneidad de varianzas (Bedoya, Mira, & Cardona, 2019).

A su vez, Gutiérrez y de la Vara (2012) también manifiestan que la dispersión de las variables es directamente proporcional a su magnitud, y esto representa una razón frecuente para que el supuesto de varianzas constantes no se cumpla. Es decir, que para valores pequeños se obtienen varianzas más homogéneas, en comparación con la variabilidad que entre sí se tienen los valores más grandes (Domínguez & Castaño, 2010).

El objetivo fundamental del ANOVA es estudiar el efecto de varios factores sobre las variables de respuestas, con la finalidad de generar conocimientos que permitan tomar acciones y decisiones que mejoren el desempeño del proceso (Montgomery, 2005). Como ya se mencionó, un resultado esperado fue que el factor muestra tuviera un efecto significativo sobre la variable de respuesta (porcentaje de azufre), ya que, como se puede observar en el Cuadro 13, cada muestra contiene una concentración de azufre distinta. Por lo tanto, los diferentes valores de porcentaje de azufre en las muestras, explican el comportamiento observado en las varianzas.

En función del análisis anterior, se puede afirmar que existe suficiente evidencia estadística para confiar en el análisis de varianza realizado, y por lo tanto, se puede concluir que la metodología desarrollada y validada en el presente estudio para la determinación de azufre por la técnica de ICP-OES, realizó mediciones de la concentración de azufre semejantes a la metodología oficial AOAC 2017.08 Azufre total por combustión, en las muestras de fertilizantes inorgánicos ingresados al LCC durante los meses de mayo y junio del año 2020.

La presente investigación le brinda al LCC un método de análisis alternativo para el control de calidad del azufre presente en los fertilizantes inorgánicos comercializados en Costa Rica. Con la metodología por ICP-OES, se realiza un adecuado control de calidad de la concentración de azufre presente en los fertilizantes, independientemente de la fuente de este elemento. En consecuencia, también se ven beneficiadas las empresas formuladoras, las cuales han solicitado al LCC el aplicar una metodología adecuada para el análisis de todas las fuentes de azufre.

Asimismo, la metodología desarrollada y validada representa una alternativa muy importante y útil para el LCC, ya que la técnica de ICP-OES permite el análisis multielemental (Pachacama, 2013; Oliveira, *et al.*, 2016). Es decir, que se pueden cuantificar simultáneamente otros elementos esenciales presentes en los fertilizantes, así como los metales pesados que también se analizan en esta matriz. Bosnak (2004) coincide con lo anterior, ya que logró determinar simultáneamente

elementos que normalmente debían realizarse mediante técnicas alternativas, como lo son el azufre, el fósforo y el boro.

En síntesis, los resultados de la presente investigación permiten recomendar la implementación del método desarrollado y validado para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos en el Laboratorio de Control de Calidad de Agroquímicos (LCC).

Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones.

6.1 Conclusiones.

Uno de los puntos críticos para la elaboración de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos por medio de la técnica de ICP-OES fue contrarrestar los efectos de las interferencias de ionización, lo cual fue posible mediante la solución amortiguadora de ionización de cesio y estándar interno de berilio.

Mediante la optimización del análisis de azufre en fertilizantes por ICP-OES se determinó que la longitud de onda de 181,972 nm y la configuración de vista del plasma de manera radial fueron las condiciones instrumentales óptimas para obtener resultados confiables y veraces del contenido de azufre en los fertilizantes inorgánicos por ICP-OES.

La masa de muestra de 0,5000 g demostró ser adecuada para la determinación de azufre por ICP-OES, con lo cual se aumenta la productividad del LCC al ahorrarse tiempo y recursos; además, se generan menos residuos por parte del laboratorio.

La metodología desarrollada para la determinación del contenido de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de ICP-OES cumplió con todos los parámetros de desempeño para la validación, establecidos por el ECA (2012). Por lo tanto, es viable su implementación en el LCC para el análisis de azufre en fertilizantes inorgánicos.

Los resultados de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos que ingresaron al LCC durante los meses de mayo y junio del 2020, demostraron que el 92,9 % de las muestras analizadas cumplieron con las tolerancias establecidas en el RTCR 485:2016 (2016), lo que evidencia que los fertilizantes analizados están conformes con la concentración de azufre declarada.

Mediante el análisis de varianza realizado, se concluyó que no existen diferencias significativas entre los resultados arrojados por el método para la

determinación de azufre por la técnica de ICP-OES y el método oficial por combustión AOAC 2017.08. Con esto se ratifica la recomendación de implementar el método de análisis de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de ICP-OES en el LCC.

La técnica de ICP-OES representa una alternativa útil y novedosa, para la determinación del contenido de azufre presente en los fertilizantes comercializados en Costa Rica.

6.2 Recomendaciones

La introducción de la muestra al sistema representó un factor crítico para una adecuada repetibilidad del análisis de azufre por la técnica de ICP-OES. Se recomienda realizar mantenimientos preventivos al sistema de introducción de la muestra y una limpieza adecuada del mismo: antes, durante y después del análisis.

Se recomienda ampliar el alcance de la metodología por ICP-OES para el análisis de otros elementos estipulados en el RTCR 485:2016 (2016), los cuales se analizan en la matriz de fertilizantes, con el fin de lograr un análisis multielemental de esta matriz.

Para un estudio futuro, se recomienda ampliar el alcance de la investigación a la matriz de fertilizantes orgánicos, con el fin de determinar si el método por la técnica ICP-OES es adecuado para esta matriz; y su posterior validación para ser implementado en el LCC.

Referencias bibliográficas.

- Abad, E. (2018). *Análisis multielemental de minerales lateríticos por ICP-OES. Efecto matriz, su reducción y posibles mecanismos* (tesis doctoral). Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.
- Acosta, A. (2015). *Determinación de azufre disponible en forma de sulfato en muestras de suelos por espectrofotometría de uv-vis utilizando monofosfato de calcio como extractante* (tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.
- Agilent Technologies, Inc. (2012). *Dedicated axial or radial plasma view for superior speed and performance*.
- Aguirre, M. (2015). *Avances en la preparación de muestras líquidas para análisis elemental con técnicas espectrométricas basadas en plasma: ICP-OES, ICPMS y LIBS* (tesis doctoral). Universidad de Alicante, España.
- AOAC. (2019). *Official Methods of Analysis of AOAC international*. 21th edition, Estados Unidos de América.
- Bedoya, J., Mira, N., & Cardona, I. (2019). Evaluación estadística de la estabilidad postural en pacientes con artrosis de rodilla por medio de coactivación muscular. *Comunicaciones en Estadística*, 12(1), 53-69.
- Bosnak, C. (2004). *High-throughput Analysis of Agricultural Soils Using the Optima ICP*. PerkinElmer, Shelton.
- Brambilla, C., Baglioni, M., Pérez, M., Savio, M., & Kloster, N. (2017). Azufre disponible y azufre total. En: N. Kloster (Ed.), *Métodos de análisis e implementación de Calidad en el Laboratorio de Suelos*, (pp. 69- 74). La Pampa, Argentina: Ediciones INTA.

- Cabildo, M., Cornago, M., Escolástico, C., Soledad, E., López, C., & Sanz, D. (2013). *Bases químicas del medio ambiente*. Madrid, España: Editorial UNED.
- Calzadilla O., Vidal, J., & Borroto, H. (2017). Detección de los errores sistemáticos en los ajustes mediante el análisis de los residuos. *Latin-American Journal of Physics Education*, 11(4), 6.
- Cánepa, Y. & Trémols, A. (2015). Importancia del Azufre en la Agricultura. *Cuba Tabaco*, 16(1), 78-86.
- Carciochi W., Divito G., Reussi N., & Echeverría, H. (2015). ¿Qué sabemos del diagnóstico de azufre en los cultivos de la región pampeana argentina?
- Carrillo de Cori, C., Ruiz, M., Aular, L., Mora, R., Castillo, L., Arrieche, I., Días, T., Fernández, S., Noguera, R., Martínez, A., & Tovar, M. (2011). Un método turbidimétrico para determinar azufre en fertilizantes inorgánicos. *Venesuelos*, 18(1), 6-15
- Castañeda, R. (2010). *Determinación de metales por Absorción atómica a la llama* (tesis de grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- CEPAL. (2014). *Anuario Estadístico de América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile.
- Chambi, M. (2019). *Evaluación del método gravimétrico y su validación respecto al de absorción atómica en la determinación de molibdeno* (Tesis de grado). Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú.
- De Anda, V., & Souza, V. (2016). Azufre: elemento incomprendido de la biogeoquímica planetaria. *Oikos*, 1(16), 25-30.

Decreto Ejecutivo N° 36801-MAG Reglamento de la Estructura Organizativa del Servicio Fitosanitario del Estado. San José, Costa Rica, 14 de octubre de 2011.

Domínguez, J. & Castaño, E., (2010). *Diseño de experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología*, Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.

ECA (2012). Curso validación en métodos de química analítica. Ente Costarricense de Acreditación.

ECA (2014a). Guía para la validación de métodos. Ente Costarricense de Acreditación.

ECA (2014b). Política de Validación de Métodos. Ente Costarricense de Acreditación.

ECA (2014c). Política de incertidumbre de las mediciones. Ente Costarricense de Acreditación.

Echeverría, H.E., Reussi, N.I., & Pagani, A. (2015). Azufre. En: H.E. Echeverría y F.O. García (Ed). *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos* (pp. 287-315). Buenos Aires, Argentina: INTA.

Fanego-Hernández, S., & Carabeo-Pérez, V. (2017). Empleo de técnicas de alta precisión en la industria azucarera para el análisis de mieles finales. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 51(3), 50-57.

FAO (2002). *Los Fertilizantes y su Uso. Una Guía de Bolsillo para los Oficiales de Extensión*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Fernández, I. (2019). *ANOVA con medidas repetidas* (tesis de grado). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.

- Fernández, S., Pérez, A., & Medina, P. (2019). Uso integral de simulación, diseño de experimentos y KANBAN para evaluar y mejorar el rendimiento de una línea de producción. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 13(26), 9-16.
- Fernández-Feal, C., Fernández-Feal, L., Escudero, P., & Pérez-Prado, J. (2009). Evolución del contenido de azufre en la gasolina comercializada en Galicia (España) como consecuencia de la aplicación del Real Decreto 1700/2003. *Información Tecnológica*, 20(1)–2009, 53-65.
- Fresco, L. (2003). Informe: *Los fertilizantes y el futuro*. FAO, Roma, Italia.
- García, A. (2015). Informe: *Fundamentos para la búsqueda, evaluación y calibración de nuevas metodologías analíticas para suelos en el trópico*. X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, Ecuador.
- González, M. & Montaña, L. (2015). La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI. *Latin-American Journal of Physics Education*. 9(4), 1-14.
- González, R. (2012). *Evaluación de un prototipo de línea de transferencia para el acoplamiento GC-ICP-MS con nebulización líquida simultánea* (tesis de maestría). Universidad de Oviedo, España.
- Gutiérrez, H. & de la Vara, R., (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México D.F, México: McGraw-Hill.
- Harris, D. (2018). *Análisis Químico Cuantitativo*. Caracas, Venezuela: Editorial Reverte S.A.
- Hines, W., Montgomery, D. (1996). *Probabilidad y estadística para ingeniería y administración*, México DF, México, Compañía editorial continental S.A.

- Huamán, M. (2017). *Aplicación del método de corrección interelemento (IEC) para determinar metales en presencia de interferentes* (tesis de grado). Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- IFA (15 de abril de 2019). About Fertilizer. *International Fertilizer Association*.
- IFA (2018). Integrated plant nutrient management: Increasing Yields and Improving Soil Health. *International Fertilizer Association*.
- Imbacuán, J. (2015). *Efecto de la aplicación de tres niveles de fertilización química en el comportamiento agronómico de dos variedades de maíz duro*. (Tesis de grado). Universidad de Babahoyo, Carchí, Ecuador.
- IPNI (17 de 04 de 2019). Fuentes de Nutrientes - Específicos. *International Plant Nutrition Institute*.
- Karadjov, M., Velitchkova, N., Veleva, O., Velichkov, S., Markov, P., & Daskalova, N. (2016). Spectral interferences in the determination of rhenium in molybdenum and copper concentrates by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 119, 76-82.
- Ladha, J., Pathak, H., Krupnik, T., Six, J., & Kessel, C. (2005). Efficiency of Fertilizer Nitrogen in Cereal Production: Retrospects and Prospects. *Advances in Agronomy*, 87, 85-156.
- Lagos, M. (2016). *Uso del nebulizador ultrasónico con el espectrómetro de emisión óptica por plasma inducido (ICP OES) para mejorar los límites de detección en la cuantificación de metales en muestras de aguas y aguas residuales* (tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Loewy, T., Pugliese, G., & Ron, M. (2008). *Nitrógeno y azufre para rendimiento y calidad del trigo en el SO Bonaerense*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Luis, Argentina.

- Lucheta, A., & Lambais, M. (2012). Sulfur in agriculture. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36(5), 1369-1379.
- Lúñez, C. (2016). *Construcción y caracterización de un nuevo nebulizador múltiple para técnicas analíticas basadas en plasma (ICP-OES, ICP-MS y MP-AES)* (tesis de grado). Universidad de Alicante, España.
- Malhi, S., & Karamanos, R. (2014). *Maximizing Yield and Quality of Canola Seed with Optimum Sulphur Fertilizer Management Practices in the Parkland Region of Western Canada*. Universidad de Saskatchewan, Canadá.
- Manzano, F., Garrido, J. & Jiménez, E. (2018). *Técnicas de investigación avanzadas en Agronomía y ciencias afines*. Almería, España: Universidad Almería.
- Martínez, M., Sánchez A., Toledo E. & Faulin J. (2020). *Bioestadística Amigable*, Barcelona, España: Elsevier Health Sciences.
- Martínez, R. (2019). *Análisis y optimización de la extracción de colorantes azoicos en vino para la detección de fraudes* (tesis de grado). Universidad de Burgos, Burgos, España.
- Martins, Y., & De Oliveira, C. (2019) Development and Validation of an UV Spectrophotometric Method for Determination of Thiamphenicol in Dosage Form. *Journal of Applied Spectroscopy*, 86(4), 629-635.
- Miller, N.J. & Miller, J.C. (2002). *Estadística y quimiometría a para química analítica*. Madrid, España: Pearson Educación S.A.
- Minitab, LLC. (2017). *Minitab® Statistical Software* (Versión 18.1)
- Miró, G. (2017). *Estudio del comportamiento y de la influencia en el desgaste de los aceites lubricantes de baja viscosidad en MCIA* (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

- Mketo, N., Nomngongo, P. N., & Ngila, J. C. (2014). A single-step microwave-assisted acid extraction of total sulphur in coal samples followed by ICP-OES determination. *Analytical Methods*, 6(21), 8505-8512.
- Molina, E. & Henríquez, C. (2003). Características y manejo de fertilizantes que contienen calcio, magnesio y azufre. En G. Meléndez, y E. Molina (Ed.) *Fertilizantes: Características y manejo* (pp. 58-68). San José, Costa Rica: Centro de Investigaciones Agronómicas- UCR.
- Montgomery, D. (2005). *Diseño y Análisis de Experimentos*, Washington, Estados Unidos: Limusa Wiley.
- Morales, J., & Gago, R. (2017). Efecto en suelos salinos y alcalinos de fertilizantes en base azufre elemental. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (289), 54-57.
- Oliveira, T., Rampazzo, R., Ferrão, M. & Pozebon, D. (2016). Method Development and Total Uncertainty Estimation for Boron, Sulfur and Phosphorus Determination in Mineral Fertilizer Using ICP-OES. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(11), 2021-2033.
- Otero, V. (2019). *Comparación y validación de métodos analíticos de rutina para la determinación de aluminio en coagulantes empleados en la potabilización de aguas* (tesis de grado). Universidad de Valladolid, Castilla y León, España.
- Pachacama, F. (2013). *Determinación de azufre, boro y fósforo en tejido foliar por espectrofotometría de emisión por acoplamiento de plasma inductivo y detección óptica (ICP-OES)* (tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Peláez, M. (2015). *UF2017 - Manejo y mantenimiento de equipos de aplicación de fertilizantes*. Málaga, España: Editorial Elearning, S.L.

- Reetz, H. (2016). *Fertilizers and their Efficient Use*. International Fertilizer Industry Association (IFA), París, Francia.
- Reyes, G. & Cortés, J. (2017). La intensidad en el uso de fertilizantes en América Latina y el Caribe 2006-2012. *Bioagro*, 29(1), 45-52.
- Rinaldi, D. (2015). *Estudio de los contenidos de elementos inorgánicos de interés ambiental en suelos afectados por derrames de combustibles derivados del petróleo* (tesis de maestría). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez, J. J. (2018). *Evaluación y determinación de metales esenciales en nueces* (tesis de grado). Universidad de Cádiz, Andalucía, España.
- Romano, N. (2012). Azufre. En A. Quiroga & A. Bono (Ed.), *Manual de fertilidad y evaluación de suelos*. Publicación Técnica (pp. 115-118). La Pampa, Argentina: Ediciones INTA.
- Rosero Valles, D. (2017). *Fundamento y aplicaciones de sistemas de especiación con "espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente" (LC-ICP-MS y GC-ICP-MS)* (tesis de grado). Pontificia universidad católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- RTCA 65.05.54:15 (2016) Fertilizantes y enmiendas de uso agrícola. Requisitos para el registro. Reglamento Técnico Centroamericano.
- RTCR 176:1991 (1991). Agroquímicos, toma de muestra. Reglamento técnico costarricense.
- RTCR 318:1998 (1999). Laboratorios para el Análisis de Sustancias Químicas y Biológicas de uso en la agricultura (1999). Reglamento técnico costarricense.
- RTCR 485:2016 (2016). Tolerancias y límites permitidos para la concentración de los elementos nutritivos, metales pesados e impurezas. Sustancias

químicas. Fertilizantes y enmiendas para uso agrícola. Reglamento Técnico Costarricense.

Salas, R. (2003). Nutrición mineral de las plantas y el uso de fertilizantes. En G. Meléndez, y E. Molina (Ed.), *Fertilizantes: Características y manejo* (pp. 119). San José, Costa Rica: Centro de Investigaciones Agronómicas-UCR.

Salvagiotti, F. & Miralles, D. (2008). Radiation interception, biomass production and grain yield as affected by the interaction of nitrogen and sulfur fertilization in wheat. *European Journal of Agronomy*, 28(3), 282-290.

Salvagiotti, F. (2016). El rol de los fertilizantes en el aumento de la producción agropecuaria. En: R. S. Lavado (Ed). *Sustentabilidad de los agrosistemas y uso de fertilizantes* (pp. 85-102). Santa Fe, Argentina: Orientación Gráfica Editora.

Sandoval, E. & Rivera, W. (2019). Correlación del CBR con la resistencia a la compresión confinada. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 29(1), 135-152.

Santos, E. (2010). *Química Y Cultura Científica*, San José, Costa Rica: Editorial UNED.

SFE. (11 de 04 de 2019). Quiénes Somos. *Servicio Fitosanitario del Estado*.

Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D. & Morante, S. (2009). *Análisis Instrumental*, La Coruña, España: Netbiblo.

Ulrich, A., Barrelet, T., Figi, R., Rennenberg, H., & Krähenbühl, U. (2009). Time resolved sulphur and nutrient distribution in Norway spruce drill cores using ICP-OES. *Microchimica Acta*, 165(1-2), 79-89.

Vanclay, E. (2019). *Maximice el funcionamiento continuado y el rendimiento de su instrumento ICP-OES*. Agilent Technologies, Inc., EEUU.

Anexo A. Certificado análisis del Sulfato de Amonio ((NH₄)₂ SO₄).**SIGMA-ALDRICH**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

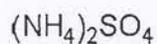
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

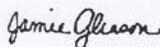
Product Name:

Ammonium sulfate 99.999% trace metals basis

Product Number: 204501
 Lot Number: MKBG1070V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 7783-20-2
 MDL Number: MFCD00003391
 Formula: H₈N₂O₄S
 Formula Weight: 132.14 g/mol
 Quality Release Date: 06 JAN 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Conforms to Requirements Powder with Chunk(s) or Crystals with Chunk(s)	Crystals
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Titration	71.2 - 74.2 %	72.1 %
%SO ₄ With Barium Chloride		
Trace Metal Analysis	≤ 20.0 ppm	1.7 ppm
Barium (Ba)		< 0.1 ppm
Calcium (Ca)		1.0 ppm
Chromium (Cr)		0.2 ppm
Magnesium (Mg)		0.1 ppm
Sodium (Na)		0.5 ppm
Purity	Conforms	Conforms
. 99.999% Based On Trace Metals Analysis		



Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Anexo B. Validación de la metodología para la determinación de azufre en fertilizantes por ICP-OES

Evaluación de la linealidad e intervalo de trabajo.

Se prepararon tres curvas de calibración de seis niveles de concentración, como se observa en el Cuadro 15, a partir de una disolución de sulfato de amonio de 1000 mg/L de azufre, certificada al 99,999 % (Oliveira, *et al.* (2016)).

Cuadro 15. Preparación de seis niveles de la curva de calibración de azufre para la validación del método de análisis de azufre por ICP-OES.

Nivel	Alícuota (μL)	Balón (mL)	Concentración nominal de azufre (mg/L)
Blanco	0,00	25,00	0,00
C1	75,0	25,00	3,00
C2	300	25,00	12,0
C3	500	25,00	20,0
C4	750	25,00	30,0
C5	1000	25,00	40,0
C6	1250	25,00	50,0

Fuente: Elaboración propia, según Oliveira, *et al.* (2016).

Se midieron por triplicado las disoluciones de la curva de calibración y del blanco de calibración. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la recta de mejor ajuste para evaluar la correlación y se tomó como criterio de aceptación un coeficiente de correlación $(r) \geq 0,995$ de acuerdo con ECA (2012).

Evaluación de la Selectividad.

Para la evaluación de la selectividad se realizaron tres blancos reactivos y tres blancos matriz de fertilizantes. Además, se analizaron tres muestras enriquecidas con 20,0 mg/L de azufre.

Posteriormente se realizó una prueba t , en la que se comparó la t calculada para los tres blancos reactivos y tres blancos matriz, con respecto a la t crítica para las seis mediciones, con un nivel de confianza del 95 %.

Según lo establecido por ECA (2012) para comparar dos medidas experimentales de muestras diferentes con desviaciones estándar similares se utiliza la Ecuación 3.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde:

\bar{x}_1 y \bar{x}_2 : promedios de las mediciones para cada grupo de muestras.

S: desviación estándar de todas las muestras.

n_1 y n_2 : grados de libertad para cada grupo de muestras.

Además, se calculó el coeficiente de selectividad para las muestras enriquecidas con respecto a los tres blancos matriz, según la Ecuación 4.

$$K_{a,i} = \frac{K_1}{K_a} \quad \text{Ecuación 4}$$

En donde:

$K_{a,i}$: coeficiente de selectividad.

K_1 : promedio de los resultados medidos para los blancos matriz.

K_a : promedio de los resultados medidos para las muestras enriquecidas.

Por su parte, el criterio de aceptación recomendado por ECA (2012) es que no debe existir diferencia significativa entre: blanco reactivo, blanco matriz y muestras con contenido de azufre.

Evaluación del límite de detección y cuantificación.

Para definir el límite de detección y cuantificación, se preparó una curva de calibración como se muestra en el Cuadro 15. Adicionalmente se prepararon siete blancos matriz, es decir, una muestra de fertilizante libre de azufre. Se realizó la medición de lo anterior y se calculó la desviación estándar de las siete mediciones.

El límite de cuantificación (LQ) y el límite de detección (LD) se calcularon según las ecuaciones 5 y 6 respectivamente, de acuerdo con AOAC (2019).

$$LQ = (10 * S) + \bar{X}_{blancos} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$LD = (3,29 * S) + \bar{X}_{blancos} * \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

$\bar{X}_{blancos}$: Promedio de los blancos.

S: Desviación estándar de las medidas.

El criterio de aceptación para el límite de cuantificación se definió como el porcentaje mínimo de contenido de azufre declarado en el reglamento técnico RTCR 485:2016 (2016) que define las tolerancias y límites permitidos para la concentración de los elementos nutritivos, metales pesados e impurezas en fertilizantes y enmiendas para uso agrícola.

Por otra parte, el criterio de aceptación para el límite de detección se definió con base en el límite de cuantificación, de manera que, si el máximo permitido para el límite de cuantificación es 0,50 %, la desviación estándar máxima permitida es 0,05 según AOAC (2019), por lo tanto:

$$\text{Criterio de aceptación } LD = (0,05 * 3,29) + \bar{X}_{blancos} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{Criterio de aceptación } LD = (0,05 * 3,29) + 0,0010\% = 0,17\%$$

Evaluación de la Veracidad.

Para la veracidad se utilizó un blanco matriz de fertilizante libre de azufre. Se enriquecieron muestras de la matriz utilizada como blanco de fertilizante a tres

niveles de concentración: 3,00 mg/L, 20,0 mg/L y 40,0 mg/L, en siete análisis independientes.

Posterior a los análisis, se procedió a calcular el porcentaje de recuperación de cada muestra individual, utilizando la Ecuación 8.

$$R = \left(\frac{C_e}{C_a} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde:

R: Porcentaje de recuperación.

C_e: Concentración del analito medido en la muestra fortificada.

C_a: Valor teórico del analito agregado en la muestra fortificada.

El criterio de aceptación para la veracidad según la AOAC (2019) es un porcentaje de recuperación de mínimo 98 % y máximo 102 %.

Evaluación de la Precisión.

Para la estimación de la precisión se evaluaron los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia, de acuerdo con ECA (2012). El procedimiento se define a continuación:

Repetibilidad

Se preparó una curva de calibración, como se indica en el Cuadro 15. Posteriormente se prepararon siete réplicas de tres muestras de fertilizantes con tres diferentes concentraciones de azufre, de manera que se representara el intervalo de trabajo completo del método.

Se analizaron las siete réplicas de cada una de las muestras y con los resultados de las mediciones se calculó el promedio, la desviación y el coeficiente de variación de cada grupo de muestras de la misma concentración, según la Ecuación 9.

$$CV (\%) = \frac{S}{P} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

En donde:

CV: Coeficiente de variación.

P: Promedio de cada grupo de medidas de la misma concentración.

S: Desviación estándar de cada grupo de medidas de la misma concentración.

El criterio de aceptación según AOAC (2019), para una concentración de trabajo menor al 1,00 % corresponde a un CV menor a 2,7 %, para una concentración de trabajo entre 1,00 % y 10,00 % corresponde a un CV menor a 1,9 % y para una concentración de trabajo mayor al 10,00 % el CV debe ser menor a 1,3 %.

Precisión intermedia

Se prepararon en siete días diferentes, tres muestras de un blanco matriz de fertilizante libre de azufre, enriquecidas a tres niveles de concentración de azufre: 3,00 mg/L, 20,0 mg/L y 40,0 mg/L respectivamente para cada muestra.

Se realizaron las mediciones en el ICP-OES, y con los datos obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados de cada una de las concentraciones individualmente, mediante la Ecuación 9.

El criterio de aceptación, según la AOAC (2019) es un Coeficiente de Variación menor a la desviación estándar relativa prevista de reproducibilidad (PRSDR) para cada concentración. Para este cálculo se aplicó la ecuación de Hortwitz (Ecuación 10):

$$PRSDR = 2C^{-015} \quad \text{Ecuación 10}$$

En donde:

PRSDR: Desviación estándar relativa prevista de la repetibilidad.

C: Fracción de masa establecida para la concentración de trabajo.

Evaluación de la Robustez

Para la prueba de robustez, se utilizó el test de Youden y Steiner para métodos analíticos. Para el cual se prepararon ocho muestras de fertilizante enriquecidas a un nivel de 20,0 mg/L de azufre.

Se realizó el análisis ocho veces, de acuerdo con la combinación factorial del Cuadro 16, para determinar la influencia de cada condición en el resultado final. Se comparó la media de los cuatro valores correspondientes a las condiciones originales (designados por letras mayúsculas) con la media de los cuatro valores correspondientes a las condiciones alteradas del método (designadas por letras minúsculas).

Cuadro 16. Combinación factorial de los parámetros analíticos para la evaluación de robustez del método de análisis de azufre por ICP-OES, mediante la prueba de Youden y Steiner.

Condiciones del método		Combinación factorial							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Cantidad de HNO ₃	A: 9,00 mL a: 10,00 mL	A	A	A	A	a	a	a	a
Cantidad de HCl	B: 3,00 mL b: 4,00 mL	B	B	B	b	B	b	b	b
Temperatura de digestión	C: 200 °C c: 190 °C	C	c	C	c	C	c	C	c
Tiempo de digestión	D: 60 min d: 50 min	D	D	d	d	d	d	D	D
Calidad del agua	E: ultrapura e: destilada	E	e	E	e	e	E	e	E
Temperatura ambiental	F: 20 °C f: 23 °C	F	f	f	F	F	f	f	F
Tiempo de calentamiento del plasma	G: 10 min g: 5 min	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados		s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: elaboración propia, según ECA (2012).

De acuerdo con ECA (2012) el criterio de aceptación para cada condición del método es:

$$(X - x) < \sqrt{2} \times S \quad \text{Ecuación 11}$$

En donde:

X-x: diferencia del promedio de los resultados obtenidos de la concentración, con la condición original del método (A, B, C, D, E, F o G) y los resultados promedios obtenidos de la concentración, con la condición alterada del método (a, b, c, d, e, f o g).

S: Desviación estándar de las ocho mediciones realizadas.

Anexo C. Muestra de cálculo de la incertidumbre para la metodología de análisis de azufre en fertilizantes por ICP-OES.

Para el cálculo de la incertidumbre se contempló la incertidumbre de cada uno de los factores contribuyentes a la incertidumbre (Ver Figura 8). A continuación, se demuestra el cálculo de la misma.

Incertidumbre de la concentración emitida por el equipo (μ_{Ce}).

La incertidumbre asociada a la concentración del equipo corresponde a la suma de la incertidumbre aportada por la curva de calibración (μ_{Cc}) y la incertidumbre aportada por el estándar de azufre (μ_{est}).

Incertidumbre asociada a la curva de calibración (μ_{Cc}).

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la curva de calibración se tomó en cuenta la incertidumbre aportada por cada punto de la curva de calibración, de acuerdo con la Ecuación 12.

$$u_{cc} = \frac{s}{b} * \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_e - \bar{C}_{cc})^2}{S_{xx}}}$$

Ecuación 12

Donde:

u_{cc} : componente de incertidumbre de la curva de calibración

s: desviación estándar residual

b: pendiente de la curva de calibración

p: cantidad de réplicas de la muestra

n: cantidad de datos

C_e : concentración de la muestra

\bar{C}_{cc} : concentración promedio de los puntos de la curva de calibración

S_{xx} : suma de cuadrados de residuales

El cálculo de la desviación estándar residual (s) se calculó de acuerdo con la Ecuación 13.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2}{n - 2}} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

α_j : lectura observada

$\bar{\alpha}$: lectura ajustada

$$s = \sqrt{\frac{2447,4539}{21 - 2}} = 11,3496 \text{ mg/L}$$

$$\bar{C}_{cc} = 24,3866 \text{ mg/L}$$

El cálculo de la suma de cuadrados de residuales (S_{xx}) está dado por la Ecuación 14.

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\gamma_i - \bar{\gamma})^2 = 1,0221 \text{ mg/L} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

γ_i : Concentración de cada disolución estándar utilizada en la curva de calibración.

$\bar{\gamma}$: Promedio de las concentraciones estándar utilizadas en la curva de calibración.

De esta manera la incertidumbre asociada a la curva de calibración para cada réplica de la muestra es de:

$$u_{cc1} = \frac{11,3496}{32,6760} * \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{21} + \frac{(24,2061 - 24,3866)^2}{1,0221}} = 0,2644 \text{ mg/L}$$

$$u_{cc2} = \frac{11,3496}{32,6760} * \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{21} + \frac{(24,0313 - 24,3866)^2}{1,0221}} = 0,2845 \text{ mg/L}$$

Incertidumbre asociada al estándar de azufre (μ_{est}).

Por otro lado, el cálculo de la incertidumbre asociada al estándar de azufre se realizó de acuerdo con la Ecuación 15.

$$u_{est} = \frac{C_e * IRM_{est}}{100} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde:

u_{est} : componente de incertidumbre por estándar utilizado

C_{est} : concentración del estándar

IRM_{est} : incertidumbre relativa máxima debido a estándar

La incertidumbre relativa máxima debido a estándar (IRM_{est}) está dada por la Ecuación 16.

$$IR = \frac{IA}{C_{est}} * 100 \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde:

IR: incertidumbre relativa

IA: incertidumbre absoluta

C_{est} : concentración del estándar

Por otro lado, la incertidumbre absoluta (IA) se calculó de acuerdo con la Ecuación 17.

$$IA = C_{est} * \sqrt{\left(\frac{u_{cert}}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_p}}{(V_p - E_p) * k_p}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{bcc}}}{V_{bcc} * \sqrt{6}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

u_{cert} : incertidumbre reportada en el certificado

u_{vp} : componente de incertidumbre del volumen de la pipeta

V_p : volumen de pipeta

E_p : error de la pipeta

k_p : coeficiente de incertidumbre expandida de la pipeta es igual a 2

$u_{v_{bcc}}$: componente de incertidumbre del volumen del balón aforado utilizado en la curva de calibración

V_{bcc} : volumen de balón aforado usado en la curva de calibración

$$C_{est1} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (0,075 - (-0,00014))}{25} = 2,9997 \text{ mg/L}$$

$$C_{est2} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (0,300 - 0,00277)}{25} = 11,8658 \text{ mg/L}$$

$$C_{est3} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (0,500 - 0,00277)}{25} = 19,8501 \text{ mg/L}$$

$$C_{est4} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (0,750 - 0,00558)}{25} = 29,7182 \text{ mg/L}$$

$$C_{est5} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (1,000 - 0,00558)}{25} = 39,6986 \text{ mg/L}$$

$$C_{est6} = \frac{C_{cert} * (V_p - E_p)}{V_{bcc}} = \frac{998,0330 * (1,250 - (-0,0127))}{25} = 50,4087 \text{ mg/L}$$

$$IA_1 = 2.990 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,000060}{(0,075 - (-0,00014)) * 2}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,00141$$

$$IA_2 = 11.828 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{(0,300 - 0,00277) * 2}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,00713$$

$$IA_3 = 19.787 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{(0,500 - 0,00277) * 2}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,00816$$

$$IA_4 = 29.624 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{(0,750 - 0,00558) * 2}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,00984$$

$$IA_5 = 39.573 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{(1,000 - 0,00558) * 2}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,0118$$

$$IA_6 = 50.249 * \sqrt{\left(\frac{0,01}{998,0330}\right)^2 + \left(\frac{0,00062}{(1,250 - (-0,0127) * 2)}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{25 * \sqrt{6}}\right)^2} = 0,0176$$

$$IR_1 = \frac{0,00141 * 100}{2,9997} = 0,04701 \%$$

$$IR_2 = \frac{0,00713 * 100}{11,8658} = 0,06013 \%$$

$$IR_3 = \frac{0,00816 * 100}{19,8501} = 0,04112 \%$$

$$IR_4 = \frac{0,00984 * 100}{29,7182} = 0,03314 \%$$

$$IR_5 = \frac{0,0118 * 100}{39,6986} = 0,02980 \%$$

$$IR_6 = \frac{0,0176 * 100}{50,4087} = 0,03502 \%$$

Por lo tanto, la incertidumbre asociada al estándar de azufre para cada réplica de la muestra es de:

$$u_{est1} = \frac{24,2061 * 0,060}{100} = 0,0145$$

$$u_{est2} = \frac{24,0313 * 0,060}{100} = 0,0144$$

Por último, la incertidumbre asociada a la concentración del equipo se determinó según la Ecuación 18.

$$u_{C_e} = \sqrt{u_{cc}^2 + u_{est}^2} \quad \text{Ecuación 18}$$

De manera que, la incertidumbre asociada a la concentración del equipo para cada una de las réplicas es:

$$u_{C_{e1}} = \sqrt{0,0145^2 + 0,2644^2} = 0,2648 \text{ mg/L}$$

$$u_{C_{e2}} = \sqrt{0,0144^2 + 0,2845^2} = 0,2849 \text{ mg/L}$$

Incertidumbre asociada al factor de dilución.

Incertidumbre asociada al balón aforado.

Para el cálculo de la incertidumbre asociada al balón aforado de 50,00 mL se utilizó la tolerancia indicada en el certificado CC36534, aportada por el fabricante para una temperatura de 20 °C. Además, se determinó la incertidumbre correspondiente a la variación del volumen debido a la temperatura. La incertidumbre asociada al balón aforado está dada por la Ecuación 19.

$$u_{vb} = \sqrt{\left(\frac{u_{tolerancia}}{\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{V_b * 0,00021 * 3}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 19}$$

$$u_{vb} = \sqrt{\left(\frac{0,0144}{\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{50 * 0,00021 * 3}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,02 \text{ mL}$$

Donde 50 corresponde al volumen del balón aforado, 0,00021 es el coeficiente de expansión térmica del agua a una temperatura de 20 °C y 3 son los grados centígrados que puede variar la temperatura del lugar de trabajo.

Incertidumbre asociada a la micropipeta.

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la micropipeta de 100 µl a 1000 µl, se tomaron los datos de resolución y exactitud reportados en el certificado de calibración 20190918-05-55. La incertidumbre debida a la micropipeta se calculó de acuerdo con la Ecuación 20.

$$u_{micropipeta} = \sqrt{\left(\frac{u_{resolución}}{\sqrt{12}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{exactitud}}{2}\right)^2} \quad \text{Ecuación 20}$$

$$u_{micropipeta} = \sqrt{\left(\frac{1}{\sqrt{12}}\right)^2 + \left(\frac{0,3}{2}\right)^2} = 0,33 \text{ mL} = 0,00033 \mu\text{l}$$

Incertidumbre asociada a la densidad.

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la densidad se utilizaron los datos de incertidumbre y resolución del certificado de calibración 20190828-81-2. La incertidumbre se calculó según la Ecuación 21.

$$u_{\rho} = \sqrt{\left(\frac{u_{cert}}{k}\right)^2 + \left(\frac{RD}{\sqrt{12}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$u_{\rho} = \sqrt{\left(\frac{0,0008}{2}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{\sqrt{12}}\right)^2} = 0,00049 \text{ g/mL}$$

Incertidumbre debida a la masa.

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la masa medida en la balanza analítica se utilizó el certificado de calibración 20190823-81, los datos se resumen en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Cálculo de los componentes de incertidumbre asociados a la masa medida en la balanza analítica.

Componente	Tolerancia	Incertidumbre de la masa (g)
μ Repetibilidad (μ_r)	0,000053	
μ Resolución (RB)	0,00010	
μ Linealidad (μ_L)	0,000065	0,000068
μ Excentricidad (μ_E)	0,00010	
Factor de expansión (k)	2	

Fuente: Elaboración propia.

Se calculó la incertidumbre asociada a la masa medida en la balanza analítica de la siguiente manera:

$$u_m = \sqrt{\left(\frac{u_r}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{RB}{\sqrt{12}}\right)^2 + \left(\frac{u_L}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_E}{k}\right)^2} \quad \text{Ecuación 22}$$

$$u_m = \sqrt{\left(\frac{0,000053}{\sqrt{10}}\right)^2 + \left(\frac{0,0001}{\sqrt{12}}\right)^2 + \left(\frac{0,000065}{2}\right)^2 + \left(\frac{0,0001}{2}\right)^2} = 0,000068 \text{ g}$$

Incertidumbre final combinada.

Incertidumbre asociada al cálculo de la concentración de la muestra.

Inicialmente, se calculó la concentración de azufre en la muestra de acuerdo con la Ecuación 2. Cabe resaltar que la muestra está declarada en porcentaje masa/masa, por lo cual, en este caso no se contempla la incertidumbre aportada por la densidad.

$$\% m/m_1 = \frac{24,2061 * 50,00 * \frac{50,00}{1,00} * 100}{(0,5003 * (1 - 0,00022)) * 1000 * 1000} = 12,0985 \%$$

$$\% m/m_2 = \frac{24,0313 * 50,00 * \frac{50,00}{1,00} * 100}{(0,5012 * (1 - 0,00022)) * 1000 * 1000} = 11,9895 \%$$

$$\% m/m = \frac{12,0985 + 11,9895}{2} = 12,0440 \%$$

Una vez identificados los factores contribuyentes a la incertidumbre, la ecuación para el cálculo de la misma es la siguiente:

$$u_{\% m/v} = \% m/v * \sqrt{\left(\frac{u_{C_e}}{C_e}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_b}}{\sqrt{6} * V_b}\right)^2 + \sum \left(\frac{u_{FD}}{\sqrt{6} * V_{FD}}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m * Erm}\right)^2 + \left(\frac{u_{\rho}}{\rho - E\rho}\right)^2} \quad \text{Ecuación 23}$$

Por lo tanto, la incertidumbre aportada por cálculo de la concentración de la muestra para cada réplica es la siguiente:

$$u_{\% m/m 1}$$

$$= 12,0985$$

$$* \sqrt{\left(\frac{0,2648}{24,2061}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{\sqrt{6} * 50}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{\sqrt{6} * 50}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{\sqrt{6} * 1}\right)^2 + \left(\frac{0,000068}{0,5003 * (1 - 0,00022)}\right)^2}$$

$$u_{\% m/m 1} = 0,1324 \%$$

$$u_{\% m/m 1}$$

$$= 11,9895$$

$$* \sqrt{\left(\frac{0,2849}{24,2061}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{\sqrt{6} * 50}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{\sqrt{6} * 50}\right)^2 + \left(\frac{0,00033}{\sqrt{6} * 1}\right)^2 + \left(\frac{0,000068}{0,5012 * (1 - 0,00022)}\right)^2}$$

$$u_{\% m/m 2} = 0,1422 \%$$

Incertidumbre asociada a la desviación estándar de los resultados de concentración de muestra.

Se calculó la desviación estándar tal como se muestra a continuación:

$$\sigma_{\% m/m} = \sqrt{\frac{(12,0985 - 12,044)^2 + (11,9895 - 12,044)^2}{2 - 1}} = 0,077 \%$$

La incertidumbre asociada a la desviación estándar de los resultados de concentración de la muestra se calculó según la Ecuación 24.

$$u_{\sigma_{\% m/m}} = \frac{\sigma_{\% m/m}}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$u_{\sigma_{\% m/m}} = \frac{0,077}{\sqrt{2}} = 0,0545 \%$$

De esta manera, la incertidumbre final combinada está dada por la Ecuación 25.

$$\mu FC_{\% m/m} = \sqrt{\left(\frac{uM_{\% m/m}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u_{\sigma_{\% m/m}}^2} \quad \text{Ecuación 25}$$

$$\mu FC_{\% m/m} = \sqrt{\left(\frac{0,1422}{\sqrt{2}}\right)^2 + 0,0545^2} = 0,11 \%$$

Donde:

$uM_{\% m/m}$: Es la incertidumbre máxima aportada por cálculo de la concentración de la muestra.

Incertidumbre expandida.

La incertidumbre final combinada (μFC) fue de 0,11 %, al multiplicar este valor por dos se obtiene una incertidumbre expandida (μ_{exp}) de 0,23 %, con un factor de cobertura de 2, a un 95 % de confianza.

Anexo D. Método oficial AOAC 2017.08 Azufre total en fertilizantes.

AOAC Official Method 2017.08 Total Sulfur in Fertilizers High-Temperature Combustion First Action 2017

(Applicable for measuring total sulfur concentration in solid and liquid inorganic fertilizers in the range of 1–100% with an LOD and LOQ of 47 and 106 µg S, respectively.)

Caution: Elemental analysis using combustion includes the risk of burn as some instrument components operate hot. Even after switching off the instrument, some components stay hot for long periods of time. Serious burns can occur if working inappropriately inside the instrument. Follow manufacturer's specific operating instructions for safest handling.

A. Principle

The procedure involves conversion of sulfur (S) species from fertilizers and chemical standards into SO_2 through combustion at a temperature $>1100^\circ\text{C}$ followed by measurement with thermal conductivity detection (TCD) or infrared (IR) detection reported as weight/weight percentage (w/w %). In the case of TCD and where simultaneous measurements of additional elements, such as carbon (C), hydrogen (H), or nitrogen (N), are performed, an intermediate SO_2 separation by thermal adsorption/desorption is necessary. In accordance, the method allows simultaneous conformation to 991.13 (see 2.4.02), Nitrogen in Fertilizers by Combustion, when using TCD.

B. Apparatus and Materials

Total sulfur measurements can be performed via three variable apparatus types depending on detection method of choice.

(a) **Apparatus A: Combustion followed by thermal conductivity detection.**—For Apparatus A type instruments, shown in Figure 2017.08A, sulfur as SO_2 is determined by TCD with helium or argon carrier gas allowing for multi-element analysis. With this setup, the test portion should be introduced into the combustion zone in a way such that atmospheric contamination is removed. Oxygen is added over the test portion at a temperature $>1100^\circ\text{C}$ converting all elements to their fully oxidized gaseous species. A catalyst, such as tungsten (VI) oxide (WO_3), inside the combustion tube is used to aid oxidation. Following combustion, gases pass through a reducing environment and halogen scrubber in order that NO_x species be converted to N_2 and removal of halogen contaminants, respectively. Other resulting combustion gas components CO_2 , H_2O , and SO_2 are scrubbed or adsorbed on analyte-specific thermal adsorption/

desorption columns. N_2 is not adsorbed and flows directly to the TCD. Each CO_2 , H_2O , and SO_2 are desorbed sequentially following the previous elements complete measurement by the TCD allowing for clear separation of the analyte species. Scrubbing materials, such as chemical or physical absorbers, may be placed between the furnace and detector to remove CO_2 and/or H_2O if determination of either C and/or H is undesired. Software processing will convert the SO_2 peak signal into a w/w percentage of S in the sample.

(b) **Apparatus B: Combustion followed by single-range IR detection.**—For Apparatus B type instruments, shown in Figure 2017.08B, sulfur as SO_2 is determined by a sulfur-specific IR detector with oxygen carrier gas. The test portion is introduced into the combustion zone where oxygen in combination with a temperature $>1100^\circ\text{C}$ converts $\text{S} \rightarrow \text{SO}_2$. A catalyst, such as tungsten (VI) oxide (WO_3), inside the combustion tube is used to aid oxidation. The gas stream is dried before entering the detector. Software processing will convert the SO_2 peak signal into a w/w percentage of S in the sample. For best results using this apparatus type, follow special instructions in section D.

(c) **Apparatus C: High-temperature combustion followed by multiple-range IR detection.**—For Apparatus C type instruments, shown in Figure 2017.08C, a weighed test portion of sample is mixed with a catalyst, such as tungsten (VI) oxide (WO_3), in a ceramic crucible. The sample is introduced into a tube furnace, at a minimum combustion temperature of 1350°C , in a stream of oxygen. During combustion, the sulfur and sulfur compounds contained in the sample are decomposed and oxidized almost exclusively to gaseous sulfur dioxide, SO_2 . Moisture, halogens, and particulates are removed from the combustion gases by reagents and filters. The combustion gases pass through a mechanical flow controller to regulate analysis flow, and then through a cell in which sulfur is measured by an IR absorption detector. Sulfur dioxide absorbs IR energy at a precise wavelength within the IR spectrum. Energy is absorbed as the gas passes through the cell body in which the IR energy can be attributed only to sulfur dioxide, and the concentration is proportional to the change in energy of the detector. One cell is used as both a reference and a measurement chamber. For best results using this apparatus type, follow special instructions in section D.

(e) **Analytical balance.**—Resolution to at least 0.1 mg.

(d) **Test portions containers.**—Typically tin foil or ceramic crucible.

(e) **Hand pellet press.**—For pelletizing powder materials.

(f) **Capsule sealing press.**—For making a gas-tight cold seal on tin capsule holding liquid materials.

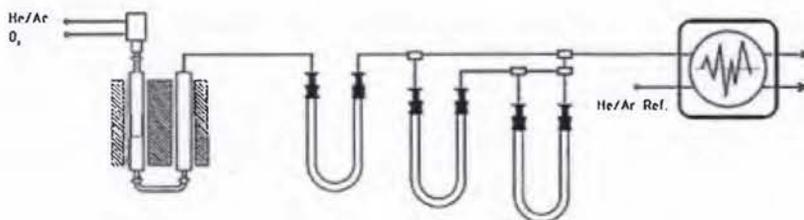


Figure 2017.08A. Typical multi-element measuring combustion system using adsorption/desorption separations and TCD.

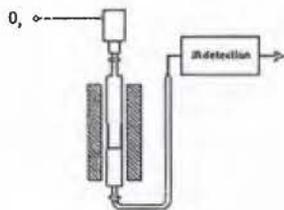


Figure 2017.08B. Typical sulfur only measuring combustion analyzer using SO_2 -specific IR detection.

C. Reagents

Items (c)–(l) are supplied by the instrument manufacturer.

- (a) Helium or argon.—Minimum 99.995% purity.
- (b) Oxygen.—Minimum 99.5% purity.
- (c) Tungsten (VI) oxide (WO_3) granulate.
- (d) Tungsten (VI) oxide (WO_3) powder.
- (e) Copper wires.
- (f) Corundum balls (inert).
- (g) Quartz wool (inert).
- (h) Silver wool.
- (i) Desiccant.
- (j) Magnesium perchlorate.
- (k) Potassium iodide.
- (l) Antimony.

D. Calibration Curve and Daily Factor

Check calibration on the instrument, B(a)–(c), daily and perform as needed according to the manufacturer's recommendation. It is recommended that a nonhygroscopic pure chemical standard or set of standards be used for calibrating the instrument, such as sulfanilamide ($\geq 99\%$), ammonium or sodium sulfate ($\geq 99\%$), or sublimed sulfur ($\geq 99\%$). Use a minimum of five calibration points to generate the calibration curve and cover the absolute sulfur range encompassing that of the expected S concentration of unknowns. For apparatus A and B type instruments, B(a) and (b), a single higher order calibration is sufficient. For apparatus C type instruments, B(c), separate linear calibrations for high and low sulfur concentrations are required. Any drift in the calibration curve can be observed and corrected for by daily use of an alternative nonhygroscopic pure chemical standard of known S concentration. Follow manufacturer's instructions for setting up and calculating drift corrections. If the drift correction or daily factor exceeds 0.9 or 1.1, perform necessary maintenance and ensure reagents in the combustion or reduction tubes are not depleted.

Special consideration for Apparatus C instruments.—Apparatus C type instruments, B(c), require that unknown and reference materials to be concentration matched. Additionally, this requires the separation of unknown samples by low and high sulfur concentrations. Low concentrations require a longer cell length that could become saturated by high sulfur samples and reference materials. Failure to separate samples by concentration could result in inaccurate results. In cases where sulfur concentrations are known, samples should be sorted and analyzed to best match the reference material calibration range. In cases where the concentration of sulfur is unknown, it is necessary to perform a test analysis to determine the approximate sulfur content.

E. Preparation of Test Samples (Analytical Samples)

(a) *Liquid fertilizers.*—Collect liquid ammonium thiosulfate fertilizers using 929.01 (see 2.1.02) or other recognized procedure. Accurately weigh, B(d), test portions containing a sulfur amount within the calibration range (typically 20–100 mg) into a tared tin capsule or ceramic crucible, B(e), already containing tungsten (VI) oxide powder, C(d), to be used as combustion aid. For tin capsules, cold weld with a capsule sealing press, B(g), and accurately weigh the test portion to at least the nearest 0.1 mg. Do not include the WO_3 powder in the final weight. Insert weight into the operating software. Optionally, the test portion can be weighed into a tin foil containing WO_3 and dried at 60°C for 2 h. After which, the foil can be pelletized, B(f), to be run as a solid.

(b) *Solid fertilizers.*—Solid elemental S fertilizers should be collected using 929.01 (see 2.1.01) or other recognized procedure. Prepare an analytical sample of sufficiently small particle size to ensure sufficient representation at the expected test portion mass, in accordance with 969.02 (see 2.3.04) or other recognized procedure. Accurately weigh, B(d), test portions containing a sulfur amount within the calibration range (typically 20–100 mg) into a tared tin foil cup or ceramic crucible, B(d), to at least the nearest 0.1 mg. Additionally, add WO_3 powder, C(d), creating an approximate 10:1 ratio of combustion aid to test portion. If using tin foil, pelletize the foil cup using an appropriate sealing device, B(f).

F. Determination

Ensure that the instrument is powered on, leak free, and the parameters are set according to the manufacturer's instructions. This includes furnace temperatures, flows, and pressures.

Ensure that reagents are not spent and still of functional use. For apparatus A type instruments, this includes C(a)–(c), (e), (h), and (i). For apparatus B type instruments, this includes C(b), (c), and (i). For apparatus C type instruments, this includes C(b), (c), (j)–(l).

Run blanks and check the calibration according to section D. Use the daily factor or recalibrate if necessary.

Prepare and weigh the test portion according to section E.

Load test portions onto the instrument and run the apparatus according to manufacturer's instructions.

Samples yielding results outside of the calibrated range must be reanalyzed with an adjusted sample mass according to section E.

G. Calculations

Element concentration (content, w/w %) is given by the instrument software. Absolute element content can be computed according to the following equation if needed:

$$A = (FV \times C) / 100$$

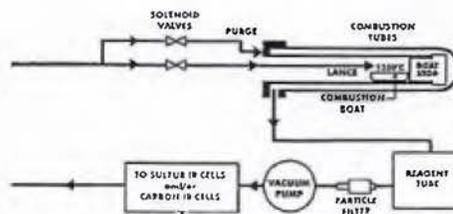


Figure 2017.08C. Typical multi-element IR detecting, high-temperature yielding combustion analyzer.

where A = absolute element content in mg, W = sample weight in mg, and C = element concentration in percentage.

To determine an appropriate sample size for analysis, use the following equation if needed:

$$W = (T \times 100) / C$$

where W = sample weight in mg, T = target absolute element content in mg, and C = element concentration in percentage. If the element concentration is not known, then use an estimated concentration and a target mass in the middle of the calibrated range.

Reference: *J. AOAC Int.* (future issue)

Posted: March 2018

Anexo E. Resultados por duplicado de la concentración de azufre en las muestras de fertilizantes inorgánicos.

Cuadro 18. Concentración de azufre obtenida por los métodos analíticos ICP-OES y combustión AOAC 2017.08 en 14 muestras de fertilizantes inorgánicos.

Muestra	Método de ICP-OES	Método de combustión
	Concentración de azufre por duplicado (%)	Concentración de azufre por duplicado (%)
1	11,23	11,95
	11,34	11,96
2	3,69	3,67
	3,68	3,70
3	6,30	6,71
	5,96	6,71
4	2,16	2,35
	2,21	2,13
5	5,00	5,12
	5,11	4,89
6	1,48	1,41
	1,52	1,57
7	3,50	2,93
	3,47	2,87
8	2,79	2,42
	2,83	2,36

Muestra	Método de ICP-OES	Método de combustión
	Concentración de azufre por duplicado (%)	Concentración de azufre por duplicado (%)
9	10,1	10,3
	10,4	10,7
10	1,18	1,03
	1,15	1,02
11	13,1	13,5
	13,0	13,6
12	10,5	9,60
	10,3	9,69
13	2,73	2,93
	2,72	2,71
14	9,32	9,09
	9,25	9,20

Fuente: Elaboración propia.

CARTA DE REVISIÓN FILOLÓGICA

San Ramón, 18 de noviembre de 2020

Sres.

Comité de Trabajos Finales de Graduación

Sede de Occidente

Universidad de Costa Rica

Estimados señores:

Por este medio yo, Carlos María Palma Zúñiga, mayor, casado, Filólogo y Curriculista, incorporado al Colegio de Licenciados y Profesores en Letras, Filosofía, Ciencias y Artes, con el número de carné 3367, vecino de San Ramón de Alajuela, portador de la cédula de identidad 202260865, hago constar:

1. Que he revisado la Tesis de Graduación para optar por el grado académico de Licenciatura en Laboratorista Químico, denominado "*Desarrollo de una metodología para la determinación de azufre en fertilizantes inorgánicos por la técnica de espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente*".
2. Que la Tesis es sustentado por la estudiante **Nancy Fabiola Rojas Ballester**, Céd. 207300148..
3. Que se le han hecho las correcciones pertinentes en acentuación, ortografía, puntuación, concordancia gramatical y otras del campo filológico.

En espera de que mi participación satisfaga los requerimientos de la Universidad de Costa Rica, se suscribe atentamente,



Carlos María Palma Zúñiga

MSc. Carlos María Palma Zúñiga
Carné No. 3367
Filólogo y Curriculista UCR.

