**Determinación de la concentración de Silicio en extractos de digestión Alcalina mediante colorimetría.**

**Andrés Felipe Beltrán Rodríguez**

**Químico Investigación y Desarrollo**

**09/03/2021**

1. **Objetivo**

El objetivo de este procedimiento es describir paso a paso el proceso de extracción y determinación del contenido de silicio en fertilizantes mediante digestión alcalina y colorimetría.

1. **Principio del método**

Los métodos vigentes para la determinación de silicio en tejido vegetal incluyen gravimetría (Yoshida 1976), fusión a alta temperatura seguida por de la generación de un cromóforo de silicomolibdeno y su cuantificación mediante colorimetría y solubilización del material vegetal o sus cenizas con ácido fluorhídrico seguida por espectrofotometría de absorción atómica o colorimetría (Hallmark 1986).

El método colorimétrico para la determinación de silicio en solución está basado en la reacción entre el ácido silicílico (Si(OH)4) y el ácido molíbdico (o molibdato de amonio) a pH 1.5-2 para formar el isómero amarillo beta silicomolibdato (SiMo12O40)4- . La formación del complejo silicomolibdato es máxima a pH 1-2. En ambientes de acidez media (pH= 3.0-3.7) es más estable el isómero alfa-silicomolibdato, el cual posee una alta estabilidad en función del tiempo. En ambientes de acidez alta, (pH 1-2) el isómero mayoritario es el beta-silicomolibdato, el cual posee una mayor sensibilidad. El uso de H2SO4 asegura la presencia mayoritaria de el beta-silicomlibdato (Govett 1961).

Las principales interferencias para la determinación colorimétrica del silicio en matrices de suelos son el hierro y fósforo. El fósforo forma un complejo de fosforomolibdeno que absorbe en los mismos rangos de longitud de onda que el silicomolibdato. Esta interferencia se puede suprimir utilizando ácido oxálico en las soluciones indicador (Schwartz 1942). La interferencia del hierro se puede eliminar al realizar las mediciones en 660nm, en vez de 820 nm (Jeffrey y Wilson 1960).

Luego de obtener el isómero amarillo, el molibdato puede ser transformado a azul de silicomolibdeno para aumentar la sensibilidad espectrofotométrica. Esta transformación se lleva a cabo mediante la reducción del isómero al reaccionar con FeSO4 7H2O en medio ácido.

La cuantificación de silicio se basa en la relación directa entre la absorbancia a 660 nm y la concentración dada por la ley de Lambert-Bouguer-beer:

Al leer las absorbancias de la curva de calibración debe confirmarse que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. Para revisar si existe esta relación, se construye un modelo de regresión simple (OLS). En el cual deben cumplir las condiciones necesarias para la homocedasticidad, además de evaluar la significancia de los parámetros de regresión, y la significancia del modelo.

1. **Controles de calidad**

**Blanco de reactivos en la curva de calibración**

Se incluye un blanco de reactivos, que no contiene estándar de silicio, pero si contiene las soluciones indicador. Se lleva al mismo volumen y es sometido al mismo tiempo de reacción que las muestras y la curva de calibración.

**Blanco de procedimiento**

Dentro de las muestras sometidas a digestión se utilizan 3 blancos que contienen todos los reactivos necesarios para la digestión de la muestra, excepto la muestra y son sometidos a los mismos procesos químicos que las muestras.

**Puntos control de concentraciones conocidas**

Como control analítico para la curva de calibración se preparan:

A partir de una solución estándar de silicio de 1,00 g/L una solución punto control de 100 mg/L

A partir de la solución punto control de 100 mg/L soluciones punto control 20 mg/L y 1 mg/L

**Réplicas de muestras**

Cada muestra debe tener mínimo tres réplicas para la evaluación de repetibilidad en el proceso de extracción y preparación de la muestra.

1. **Curva de calibración**

Para la cuantificación del contenido de silicio en los ítems de ensayo se prepara una curva de calibración en el rango de 1 a 100 mg Silicio/L:

|  |  |
| --- | --- |
| Nivel | Concentración (mg Si / L) |
| 1 | 1 |
| 2 | 2 |
| 3 | 5 |
| 4 | 10 |
| 5 | 20 |
| 6 | 50 |
| 7 | 75 |
| 8 | 100 |

1. **Procedimiento (paso a paso)**

**5.1 Extracción mediante digestión alcalina de la muestra**

* Seleccionar un conjunto de vasos de digestión el cual podrá encontrar guardado dentro de una caja de 22 tubos de plástico rotulado con uno de los siguientes códigos: “TAR-#” o “TNR-#”. Es importante no utilizar tubos de cajas diferentes para que todos los tubos pasen por el mismo proceso.
* Verifique que los tubos no se encuentren rayados, no deben estar, ni deben ser rayados ni marcados.
* Disponer los tubos de manera ordenada en una gradilla de metal numerada y marcar la gradilla con el código de la caja de los tubos que fue seleccionada para el ensayo.
* Es importante **NO** marcar los tubos de ninguna forma para conservar su integridad.
* Pesar en una balanza analítica 0.1g de muestra y transferir al tubo de teflón evitando que la muestra se adhiera a las paredes del tubo.
* Registrar los pesos de las muestras en el formato que corresponda al número de muestras que se van a someter al proceso de digestión dentro del formato F-ACL-503.
* Añadir 2.5 mL de agua tipo 1 HPLC y permitir la digestión durante 12 horas.
* Luego de cumplir las 12 horas, añadir 3 mL de peróxido de hidrógeno (H2O2) 30 % e inmediatamente cerrar los tubos con los trompos y las tapas respectivas (**Nota:** Los tubos mal cerrados implican una liberación de gases que pueden generar daño en algunas partes del equipo, y resultar en la inhalación de estos por parte del personal).
* Limpie y seque el exterior de los tubos exhaustivamente eliminando todos los restos de agua.
* Siga el instructivo de uso de microondas I-ACL-091 para el proceso de digestión.
* Una vez terminada la digestión, y los tubos estén a una temperatura menor a 60C, retire cuidadosamente el rotor del equipo.
* Transfiera cuidadosamente los tubos del rotor a la gradilla seleccionada para el proceso, con especial cuidado en la introducción para evitar daño en los tubos.
* Lleve la gradilla a la cabina de extracción y abra los vasos de manera lenta y controlada y apuntando la tapa hacia la parte trasera de la cabina, retirando solo la tapa.
* **PELIGRO:** Para este paso es obligatorio usar gafas de seguridad, guantes y bata. La liberación de gases puede estar acompañada de vapores ácidos, por lo tanto, debe realizarse la apertura detrás del vidrio de protección de la cabina.
* Seleccione papeles filtro que estén libres de humedad y registre su peso, marque cada papel filtro con lápiz para identificarlo y relacionarlo con su respectiva muestra.
* Prepare un tubo falcon de 50 mL para recibir el sobrenadante de la filtración para cada muestra. Registre el peso de cada tubo falcon asociado a cada muestra en el formato F-ACL-503 que contiene la masa inicial de las muestras.
* Filtre el contenido de los tubos, haciendo dos lavados cuantitativos con agua tipo 1 HPLC de 2 mL en el tubo y un lavado de 2 mL en el filtro.
* Ubique los vasos en una canasta. Según la aplicación para la que fueron usados, deben quedar en agua y jabón o agua y ácido nítrico hasta su lavado para evitar manchado en los vasos. Los vasos deben ser lavados por la persona encargada inmediatamente sean observados. No se debe usar materiales que puedan rayar la superficie de los vasos al momento del lavado.
* Luego de que los filtros estén secos, transfiéralos a un recipiente de secado y séquelos en estufa a 80 C por dos horas.
* Registrar la masa de los filtros con el precipitado después del secado.
* Los extractos deben ser neutralizados debido al exceso de hidróxido de sodio utilizando como indicador fenoftaleína. Este Indicador será incoloro al principio de la neutralización debido al alto pH del extracto.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Estructura |  |  |  |
| Color | incoloro | Rosado a fucsia | Incoloro |
| pH | 0−8.3 | 8.3-10 | >10 |

* La neutralización debe llevarse a cabo con ácido nítrico 8M. Añadir gota a gota y agitar cuidadosamente hasta que se de el viraje de rosado a incoloro.
* Llevar las muestras a una masa final de 25 g con agua tipo 1 HPLC (**Nota:** Tenga en cuenta el peso inicial del tubo falcon previamente registrado para calcular la masa final del tubo. Masa final del tubo = Masa inicial del tubo + 25 g) Registre la masa real en la columna **Masa final tubo (g)** del formato F-ACL-503.
* Realizar las diluciones que considere necesarias para que la concentración de silicio en el ítem de ensayo tenga preferiblemente un valor entre 20 y 50 mg/L.

**5.2. Preparación de soluciones indicador para colorimetría**

El proceso de detección de silicio se realiza mediante una reacción en dos pasos, para cada paso se requiere una solución fresca preparada el mismo día de la determinación. Las cantidades están basadas en la preparación de 300 mL para revelar 30 muestras incluyendo la curva de calibración.

**Solución 2:**

* En un frasco schott de 500 mL añadir 50 mL de agua tipo 1 HPLC.
* Utilizar los siguientes EPP: máscara de gases con filtro para vapores de SO2 3M 6003, gafas de seguridad. Además, utilizar el peto antiderrame y los guantes de manga larga disponibles en la entrada del laboratorio de digestiones.
* Encender la cabina de extracción en la entrada del laboratorio de digestiones.
* Añadir cuidadosamente 50 mL de Ácido sulfúrico 85% R.A. utilizando el dispensador de ácido para añadir el ácido sobre el agua que se encuentra en el frasco schott. Esperar a que esta solución llegue a temperatura ambiente.
* Mientras la solución anterior llega a temperatura ambiente, pesar en un nuevo frasco schott de 500 mL 8 g de Ácido oxálico C2H2O4 Junto con 2.4 g de sulfato ferroso hepta hidratado FeSO4 7H2O y disolver en 200 mL de agua tipo 1 HPLC.
* Una vez la solución de ácido esté a temperatura ambiente, mezclar las dos soluciones dentro de una cabina de extracción. La solución debe pasar de un amarillo lechoso a un amarillo traslúcido.

**Solución 1**

* Pesar 4 g de heptamolibdato de amonio (NH4)6Mo7O24 y transferirlos a un frasco schott de 500 mL .
* Disolver con 286 mL de agua tipo 1 HPLC.
* Agregar cuidadosamente 14 mL de ácido clorhídrico HCl 37%.

**5.3. Preparación de soluciones de lectura**

* Agregar con una transfer-pipeta de 1000 uL, 1 mL de las muestras, diluciones o niveles de calibración a un balón de 50mL.
* Preparar un cronómetro para medir el tiempo entre adiciones de las soluciones indicador.
* Agregar 10 mL de la **solución 1**, en todos los ítems de ensayo incluyendo la curva de calibración
* Esperar 10 minutos a partir de la adición de la **solución 1**
* Agregar 10 mL de la solución 2, en todos los ítems de ensayo incluyendo la curva de calibración.
* Llevar a volumen y transferir las muestras y niveles de la curva de calibración a tubos falcon de 50 mL
* Medir la absorbancia en 660 nm después de 3 horas y antes de 12 horas a partir de la adición de la solución 2.

1. **Cálculos**

Una vez obtenidos los parámetros del modelo de regresión, pendiente e intercepto, Si estos son significativamente diferentes de cero, pueden ser utilizados para calcular mediante interpolación la concentración de silicio presente en las muestras.

1. **Bibliografía**
   * + Yoshida, S., Forno, D. A., & Cock, J. H. (1971). Laboratory manual for physiological studies of rice. *Laboratory manual for physiological studies of rice.*
     + Hallmark, C. T., Wilding, L. P., & Smeck, N. E. (1983). Silicon. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, *9*, 263-273.
     + Govett, G. J. S. (1961). Critical factors in the colorimetric determination of silica. *Analytica Chimica Acta*, *25*(1), 69-80.
     + Schwartz, M. C. (1942). Photometric determination of silica in presence of phosphates. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, *14*(11), 893-895.
     + Jeffery, P. G., & Wilson, A. D. (1960). A combined gravimetric and photometric procedure for determining silica in silicate rocks and minerals. *Analyst*, *85*(1012), 478-486.
     + Saihua, L., Yunhe, X., Ji, X., Juan, H., Bocharnikova, E. A., & Matichenkov, V. V. (2018). Microwave digestion for colorimetric determination of total Si in plant and mineral samples. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 49(7), 840-847.
     + Mayerhöfer, T. G., Pahlow, S., & Popp, J. (2020). The Bouguer‐Beer‐Lambert law: Shining light on the obscure. ChemPhysChem. doi:10.1002/cphc.202000464
     + Miller, J. N. (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst*, *116*(1), 3-14.
     + Matichenkov, V. V. (2007). Soil gradation on the plant-available Si. *Agrochemistry*, *7*, 47-58.
2. **Residuos**

Los ítems de ensayo y los niveles de la curva de calibración están a pH ácido y contienen molibdeno, silicio y hierro, además de ácido oxálico. Todos los residuos deben manejarse con especial cuidado de que no tengan contacto con la piel o mucosas, y ser dispuestos en un contenedor de residuos etiquetado con su identificación correspondiente.

1. **Recomendaciones finales**

Revisar fichas de seguridad de todas las sustancias asociadas al procedimiento.

Uso obligatorio de gafas, guantes, bata y calzado de seguridad.