



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Optimización de un Procedimiento de Disolución de Muestras
de suelo para la Determinación de Contenidos Totales de
Elementos Traza Utilizando un Diseño de Experimentos**

Autor: Maripili Gutiérrez Rodríguez

Tutor: Marisol Vega Alegre

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Marisol Vega y al personal del departamento de química analítica de la Universidad de Valladolid

A Begoña, Rosalía y el personal del Laboratorio de Técnicas Instrumentales

RESUMEN

Los elementos traza, especialmente los metales pesados, se clasifican como los contaminantes ambientales antropogénicos más peligrosos debido a su naturaleza persistente y alta toxicidad. La determinación de sus concentraciones totales en sedimentos y suelos se realiza comúnmente para evaluar el grado de contaminación de los ambientes acuáticos y terrestres.

La técnica ICP-MS se utiliza ampliamente para la determinación de elementos traza, ya que combina una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico con capacidad multielemental. Antes de la determinación, las muestras de suelo y roca deben ser disueltas. La digestión ácida por microondas, MWD, es hasta la fecha el método más apropiado para la disolución de este tipo de muestras. Los métodos de digestión parcial que utilizan ácidos se consideran apropiados para el análisis pseudototal, pero no disuelven completamente los silicatos. Solo el método USEPA 3052, basado en el tratamiento de la muestra con ácidos nítrico, clorhídrico y fluorhídrico en un horno microondas permite una disolución total. A pesar de la gran cantidad de publicaciones sobre el análisis de elementos traza en suelos y rocas, existen conclusiones diferentes y a veces contradictorias sobre las condiciones óptimas y la eficiencia de la técnica, lo que apunta a la necesidad de optimizar el procedimiento de disolución.

En este trabajo, la optimización del procedimiento de MWD para disolver muestras de suelos para la determinación de elementos traza totales por ICP-MS se ha llevado a cabo utilizando un diseño experimental de Taguchi. Los factores de control ensayados fueron: volúmenes de ácido nítrico (N), ácido fluorhídrico (F) y ácido clorhídrico concentrados (C), tiempo de digestión (t), temperatura (T) y método de eliminación del exceso de HF (E). Los seis factores se ensayaron a tres niveles para detectar efectos cuadráticos y se asignaron a seis columnas de diseño ortogonal $L_{27}(3^{13})$ de Taguchi. Las columnas restantes del diseño experimental se utilizaron para estudiar las interacciones de los factores $F \times T$, $F \times E$ y $T \times E$. Este diseño experimental se aplicó a la determinación, por ICP-MS, de 17 elementos traza en una muestra de suelo con contenidos certificados (CRM GBW07402 GSS-2, *Institute of Geophysical and Geochemical Exploration*, Langfang, China). Los elementos se seleccionaron para representar grupos de diferentes características o reactividad: elementos tóxicos, elementos formadores de cloruros, elementos difícilmente solubilizables, elementos ligeros, elementos volátiles y tierras raras (As, Be, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Ga, Ni, Pb, Sb, Sn, Th, Tl, U, Y, Zn). El propósito del experimento fue minimizar el sesgo en la determinación de elementos traza maximizando las cantidades de elementos extraídos. Alícuotas de 0,25 g del CRM se digirieron en las diferentes condiciones fijadas por el diseño experimental y las disoluciones obtenidas se diluyeron con agua ultrapura. Los estándares de calibración y las muestras digeridas se midieron por ICP-MS en comparación con los estándares internos adecuados para mejorar la precisión.

El Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados mostró qué factores tuvieron un efecto significativo en la disolución de muestra: $E > F > C$. Los factores t, N y T en general no fueron significativos. Sin embargo, las condiciones óptimas de MWD no fueron idénticas para los 17 elementos. Los niveles óptimos de los factores que produjeron la recuperación máxima de la mayoría de los elementos fueron: N3 (6 mL), F2 (2 mL), C3 (2 mL), t2 (15 min), T1 (180 °C) y E2 (exceso de HF eliminado por evaporación) para Be, Cr, Cu, Ni, Sb, Tl, Zn o E3 (adición de 1,4 g de ácido bórico y 5 min MW de calentamiento a 180°C) para As, Cs, Dy, Ga, Sn, Th, Tl, U, Y.

ABSTRACT

Trace elements, especially heavy metals, are categorized as the most hazardous anthropogenic environmental pollutants due to their persistent nature and high toxicity. The determination of total concentrations of toxic trace elements in sediments and soils is commonly done to evaluate the degree of contamination of aquatic and terrestrial environments.

ICP-MS is widely used for the determination of trace elements as it combines high sensitivity and wide dynamic range with multi-elemental capability. Prior to determination, soil and rock samples must be dissolved. Acidic digestion by microwave, MWD, is to date the most appropriate method for the dissolution of this kind of samples. The partial digestion methods using acids are considered appropriate for pseudo-total analysis, but they do not completely dissolve silicates. Only the microwave-assisted USEPA 3052 method using nitric, hydrochloric and hydrofluoric acids in a MW oven, allows a total sample digestion. In spite of the large number of publications on soil and rock sample digestion, there are different and sometimes contradicting conclusions on the efficiency of the MWD technique, thus pointing to the necessity of MWD optimization.

In this work, the optimization of a MWD procedure to dissolve soil samples for the determination of total trace elements by ICP-MS has been carried out using a Taguchi experimental design. The control factors assayed were: volumes of concentrated nitric acid (N), hydrofluoric acid (F) and hydrochloric acid (C), digestion time (t), temperature (T) and method used for excess HF elimination (E). The six factors were assayed at three levels to detect quadratic effects and assigned to six columns of a Taguchi's $L_{27}(3^{13})$ orthogonal design. The remaining columns of the experimental design were used to investigate factor interactions $F \times T$, $F \times E$ and $T \times E$. This experimental design was applied to the determination, by ICP-MS, of 17 trace elements in a soil sample with certified contents (CRM GBW07402 GSS-2, Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, Langfang, China). The elements were selected to represent groups of different characteristics or reactivity: toxic elements, chloride-forming elements, hardly soluble elements, light elements, volatile elements and rare earths (As, Be, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Ga, Ni, Pb, Sb, Sn, Th, Tl, U, Y, Zn). The purpose of the experiment was to minimize bias in the determination of trace elements by maximizing the amounts of elements dissolved. Aliquots of 0,25 g of the soil sample were digested in the different conditions fixed by the experimental design and the digestates were diluted to volume with ultrapure water. Calibration standards and digested samples were measured by ICP-MS in comparison with the adequate internal standards to improve accuracy.

Analysis of Variance (ANOVA) of the results showed the factors with significant effect on the sample dissolution efficiency: $E > F > C$. The effects of t, N and T were in general non-significant. However, the optimal MWD conditions were not identical for the 17 elements. The optimal levels of the factors yielding maximum recovery of most assayed elements were: N3 (6 mL), F2 (2 mL), C3 (2 mL), t2 (15 min), T1 (180 °C) and E2 (excess HF removed by evaporation) for Be, Cr, Cu, Ni, Sb, Tl, Zn, or E3 (addition of 1,4 g of boric acid and 5 min MW heating at 180 °C) for As, Cs, Dy, Ga, Sn, Th, Tl, U, Y.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Elementos traza tóxicos en el medio ambiente.	1
1.2 Técnicas analíticas para la detección de elementos traza.	2
1.3 Preparación de muestras de suelo para análisis de trazas.	5
1.4 Optimización mediante diseños experimentales.	9
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
3.1 Materiales.	13
3.2 Elección de los metales.	15
3.3. Diseño de experimentos.	15
3.4 Procedimiento analítico.	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
4.1 Resultados experimentales.	24
4.2 Repetibilidad del método.	28
4.3 Graficas de medias.	29
4.4 ANOVA.	32
4.5 Elección de los niveles óptimos de los factores significativos.	36
4.6 Propuesta de método.	37
5. CONCLUSIONES.	39
6. REFERENCIAS.	41
ANEXOS.	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Elementos traza tóxicos en el medio ambiente

En las últimas dos décadas ha habido un aumento en la conciencia pública sobre los peligros planteados por la contaminación del medio ambiente debido a sustancias tóxicas. Muchas investigaciones se han llevado a cabo como resultado de los temores sobre la salud y los efectos ecológicos de la contaminación por metales pesados y otros contaminantes presentes en el medio ambiente (*Sandroni et al, 2003*). Se considera que los elementos traza, especialmente los metales pesados, son una de las principales fuentes de contaminación en el medio ambiente (*Krishna et al, 2009*); además han sido clasificados como la clase más peligrosa de contaminantes ambientales antropogénicos debido a su naturaleza persistente, acumulativa, a su elevada toxicidad (*Soodan et al, 2014*), y al efecto significativo que ejercen en la calidad ecológica de los ecosistemas (*Krishna et al, 2009*), afectando al funcionamiento y productividad de los suelos, a la calidad del agua y del aire y, en último término, a la salud de los seres vivos (*Gallo et al, 2018*).

Los elementos traza tóxicos, ETT, engloban tanto metales pesados (Fe, Mn, Ni, Co, Zn, Cu, Cr, V, Ti, Cd, Hg, Mo y otros metales traza), metaloides como As, Se y no metales como F (*Moor et al, 2001*). Todos ellos están presentes de forma natural en el medio ambiente. La concentración de ETT en la capa superficial del suelo puede generarse por los procesos de formación del suelo (*Alsaleh et al, 2018*) y están asociadas con ciclos biológicos y geoquímicos (*Abollino et al, 2002*).

La contribución natural de los ETT en suelos y sedimentos depende en gran medida del tipo de roca dominante (*Krishna et al, 2009*); sin embargo, la concentración de algunos elementos puede verse notablemente incrementada a nivel local debido a fuentes antropogénicas relacionadas con la quema de combustibles fósiles, la industria metalúrgica, minera y química, el transporte, la eliminación de desechos (*Abollino et al, 2002; Giuliano et al, 2007*), los incineradores para residuos urbanos (*Geana et al, 2011*), la aplicación de fertilizantes inorgánicos y pesticidas que contienen metales (*de Carvalho et al, 2015*) o las enmiendas con fertilizantes orgánicos procedentes del tratamiento de residuos diversos como lodos de depuradora o compost.

Las tierras raras también se utilizan en una serie de aplicaciones industriales y tecnológicas, por lo que pueden pasar al medio ambiente y se pueden acumular en el suelo y los sedimentos (*Ardini et al, 2010*). Las tierras raras son más difíciles de encontrar y producir, se utilizan casi exclusivamente en productos de alta tecnología (Dy en drones, Er en fibra óptica, Y en la industria aeroespacial, Gd en resonancia magnética, entre otras) (*Aguiar de Medeiros y Trebat, 2017*).

La presencia de metales pesados en el suelo puede afectar a la actividad de los microorganismos y al crecimiento de las plantas. La modificación de las condiciones ambientales puede favorecer la movilización de estos metales, que son transportados y dispersados por las aguas superficiales y subterráneas, afectando a áreas y ecosistemas más amplios (*Geana et al, 2011; Güven y Akinci, 2011*), pudiendo llegar fácilmente a la cadena alimentaria (*de Carvalho et al, 2015*).

Para los seres humanos, los ETT representan un grave riesgo para la salud pues pueden entrar en el organismo a través de diversas rutas de exposición, siendo la ingestión directa por el agua de bebida y los alimentos contaminados la vía más frecuente y peligrosa, seguida de la inhalación de partículas de polvo del suelo o humo, o el contacto a través de la piel (*Soodan et al, 2014*).

El análisis total de metales pesados en sedimentos y suelos se realiza comúnmente para evaluar el grado de contaminación de los mismos y el riesgo que suponen para los ambientes acuáticos y terrestres circundantes (*Geana et al, 2011*). Para desarrollar conceptos de evaluación de riesgo y desarrollo sostenible para suelos contaminados, se necesita una determinación precisa de las concentraciones de elementos nocivos y tóxicos (*Moor et al, 2001*).

Además de la contaminación, hay más motivos para analizar los metales presentes en suelos y sedimentos como pueden ser la prospección geoquímica o la fertilización de suelos agrícolas. La prospección geoquímica se vale de métodos químicos para descubrir depósitos minerales sepultados bajo cubiertas de materiales sedimentarios. La presencia de una veta subterránea se puede deducir de los análisis químicos efectuados en el material de la superficie (*Grys, 1961*). La fertilización del suelo incide en la producción, por lo que se estudian las necesidades de fertilización de los suelos agrícolas y las necesidades de nutrición de las plantas (*Benito y Ruiz, 1973*).

Debido a todo esto y a que suelos y sedimentos actúan como sumideros y reservorios de elementos traza tóxicos, muchos investigadores han puesto énfasis en explorar varias técnicas para el análisis de metales pesados (*Soodan et al, 2014*).

1.2 Técnicas analíticas para la detección de elementos traza

El desafío de la detección de metales pesados en suelos y sedimentos es doble. Por un lado, la mayoría de técnicas disponibles con sensibilidad suficiente para detectar estos elementos precisan que el analito esté en fase disuelta, lo que implica etapas de preparación de muestra en las que se emplean reactivos concentrados que pueden interferir en la determinación afectando negativamente la precisión y veracidad de los resultados. Para muestras sólidas como lodos, suelos y sedimentos, el analito se extrae habitualmente en medio fuertemente ácido o se lleva a cabo una digestión completa de la muestra antes del análisis (*Güven y Akinci, 2011; Okorie et al, 2010; Roje 2011; de Carvalho et al, 2015*). Este tratamiento de muestra suele ser la fuente dominante de error sistemático pues ejerce un importante efecto matriz durante la detección que no siempre es correctamente corregido (*Moor et al, 2001*).

Por otro lado, los niveles de concentración son generalmente muy bajos, y la disolución previa de la muestra diluye aún más al analito, por lo que se requieren técnicas de análisis muy sensibles y que sean a la vez selectivas y multielementales para poder determinar, en el menor tiempo posible, diferentes elementos de interés.

Los métodos más comunes utilizados para la determinación de metales pesados en muestras ambientales involucran técnicas espectroscópicas altamente sensibles (*Krishna et al, 2009*), que permiten el análisis de un gran número de analitos en un tiempo razonablemente corto. El uso exitoso de estas técnicas depende de varias condiciones: buenos límites de detección, rangos lineales amplios, compatibilidad con diferentes mezclas de ácidos para la disolución de la muestra y baja sensibilidad a los efectos de la matriz (*Betinelli et al, 2000*).

Varios organismos reguladores y laboratorios privados han desarrollado métodos diversos que se aplican de manera rutinaria para la cuantificación y el monitoreo de elementos traza en suelos y sedimentos (*Soodan et al, 2014*). Cabe destacar el uso de espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF), espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), o espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (*de Carvalho et al, 2015; Güven y Akinci, 2011; Kazi et al, 2009; Soodan et al, 2014*).

Espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF)

Se basa en la medida de la emisión secundaria o fluorescente de radiación X generada al excitar una muestra con una fuente de radiación X. La radiación X incidente o primaria expulsa electrones de capas interiores del átomo. Los electrones de capas más externas ocupan los lugares vacantes, y el exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones (radiación X fluorescente o secundaria), con una longitud de onda que depende del gradiente energético entre los orbitales electrónicos implicados y es característica del elemento, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra. Es aplicable al análisis químico elemental cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo de los elementos comprendidos entre el berilio y el uranio, tanto en muestras sólidas como líquidas. Entre sus ventajas cabe destacar que es una técnica no destructiva y rápida, que requiere escaso tratamiento de muestra y con muy bajo consumo de reactivos, y proporciona resultados muy reproducibles y exactos en el caso de elementos mayoritarios. Su principal inconveniente viene impuesto por su sensibilidad limitada, que dificulta la cuantificación precisa de elementos traza (*Soodan et al, 2014; Ardini et al, 2010*).

Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES)

En las técnicas de plasma acoplado inductivamente (ICP), se introduce una corriente de argón en un campo de radiofrecuencia donde la energía cinética de los iones Ar^+ genera temperaturas muy elevadas que producen la ionización y excitación de los elementos de la muestra. En la técnica ICP-OES, al volver los electrones al estado fundamental se emite radiación de longitud característica que permite la identificación del elemento, y cuya intensidad es proporcional a la concentración de dicho elemento en la disolución de la muestra. ICP-OES es una de las técnicas más utilizadas para la estimación del contenido de elementos mayoritarios y traza en muestras de suelos debido a su rapidez, amplio rango dinámico, sensibilidad y exactitud; además, los desarrollos tecnológicos recientes en ICP-OES han mejorado su precisión y robustez frente a matrices analíticas complejas y su capacidad de detección, pudiendo determinarse concentraciones por debajo del mg/L sin dificultad (*Soodan et al, 2014*). No obstante, para la determinación de elementos a muy bajo nivel de concentración, como los que presentan habitualmente metales pesados o y tierras raras (REE), la sensibilidad es aún insuficiente. Además, en la determinación de los REE se producen a menudo interferencias espectrales y generalmente se requiere la separación por cromatografía antes del análisis instrumental (*Ardini et al, 2010*).

Espectrometría de masas de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)

La etapa de excitación es igual que en ICP-OES: la muestra se introduce en el plasma de argón a través de un nebulizador que la convierte en un aerosol muy fino. El plasma seca el aerosol, disocia las moléculas e ioniza los elementos arrancándoles un electrón (M^+). Estos iones pasan, a través de un cono (habitualmente de Ni), de la presión atmosférica del plasma al vacío del espectrómetro de masas cuadrupolo que separa los iones en función de su masa y los dirige hacia un detector iónico. Al impactar en el detector, los iones liberan una cascada de electrones que son amplificados para convertirlos en una corriente eléctrica medible. La intensidad de la corriente generada es proporcional a la concentración del elemento en la muestra. Eligiendo la masa del isótopo más abundante de un elemento se consiguen sensibilidades muy altas. También se pueden medir relaciones isotópicas que permiten investigar la fuente de ciertos elementos traza. En muchos casos, antes de entrar en el espectrómetro de masas los iones atraviesan una celda de colisión/reacción que elimina muchos iones interferentes mejorando la sensibilidad y la exactitud de los resultados (*Ardini et al, 2010; Moor et al, 2001*).

ICP-MS presenta múltiples ventajas que la han convertido en la técnica más demandada actualmente para el análisis de elementos traza: los límites de detección, por debajo de la ppb, permiten la detección de prácticamente todos los elementos de la tabla periódica, incluidas las tierras raras; el amplio rango dinámico permite la determinación simultánea de elementos a niveles de concentración muy diferentes sin necesidad de sucesivas diluciones de la muestra, simplificando y acortando el tiempo de análisis; permite la determinación de numerosos elementos en un mismo barrido, lo que se traduce una elevada productividad; permite realizar análisis isotópico; combinado con una técnica de separación cromatográfica, permite la especiación de elementos, que es una determinación muy demandada pues se relaciona habitualmente con la diferente toxicidad de las especies químicas de un elemento; la tecnología actual permite reducir la mayor parte de interferencias, lo que se traduce en una elevada precisión y exactitud de las mediciones (*Okorie et al, 2010; Roje, 2011; Geana et al, 2011; de Carvalho et al, 2015*).

Voltamperometría de redisolución

Aunque las técnicas espectroscópicas son las más empleadas en análisis de ETT en el medio ambiente, algunas técnicas electroanalíticas pueden competir en cuanto a límites de detección con las técnicas espectroscópicas más sensibles.

La mayor ventaja de las técnicas electroquímicas estriba en su simplicidad y bajo coste de adquisición y mantenimiento. Los equipos son compactos y robustos, con pocas partes móviles y son relativamente simples de automatizar.

La voltamperometría de redisolución ha sido ampliamente utilizada para la determinación de metales pesados, permitiendo la determinación simultánea de diversos iones metálicos en una gran variedad de matrices (*Wang y Yue, 2017*).

Las especies químicas a analizar deben ser oxidables o reducibles sobre el electrodo de trabajo (electroactivas). El parámetro que controla el proceso de oxidación/reducción es el potencial aplicado al electrodo.

La determinación se inicia con una etapa de preconcentración en la que un microelectrodo, sumergido en la disolución agitada del analito para provocar el transporte del analito hacia la interfase electrodo-disolución, es sometido durante un tiempo controlado a un potencial constante catódico, reductor (voltamperometría de redisolución anódica, VRA) o anódico, oxidante (voltamperometría de redisolución catódica, VRC), de forma que el analito se deposita y concentra en la superficie del pequeño electrodo en forma reducida (VRA) u oxidada como óxido o complejo metálico (VRC). Tras esta etapa, se detiene la agitación y se inicia un barrido de potencial anódico (VRA) o catódico (VRC), lineal o pulsado, y se registra la corriente originada al producirse la redisolución del elemento depositado, obteniéndose un voltamperograma en el que la posición de los picos en el eje de potencial permite la identificación de la especie analizada y la altura (intensidad) o área (carga) es proporcional a la concentración de analito en la muestra. La sensibilidad de la técnica se puede adaptar al nivel de concentración aumentando o disminuyendo el tiempo de deposición aplicado.

Los principales inconvenientes de la voltamperometría de redisolución son su menor selectividad y la seria interferencia causada por la matriz analítica, que obliga a aplicar el método de adiciones patrón como método de calibración, alargando sensiblemente el tiempo de análisis.

1.3 Preparación de muestras de suelo para análisis de trazas

Los dos procedimientos aplicables a la disolución de muestras de suelo y sedimentos son la fusión alcalina y la digestión por vía húmeda con ácidos minerales, empleando como sistema de calentamiento una placa calefactora o un horno de microondas (*de Carvalho et al, 2015*).

Fusión alcalina

Se utiliza para la disolución de rocas silicatadas. Los reactivos fundentes empleados con este fin son carbonato sódico, metaborato de litio, hidróxidos sódico y potásico, trióxido de boro, o una mezcla de carbonato cálcico y cloruro amónico. La elevada concentración de fundente empleada puede incrementar notablemente los blancos analíticos. Las altas temperaturas suponen otra importante fuente de error al favorecer la pérdida de elementos volátiles. Se considera que la fusión con metaborato de litio puro, LiBO_2 , es una técnica versátil para la digestión de muestras de roca, pero tampoco garantiza la exactitud del análisis (*Cave y Harmon, 1997; Fedyunina et al, 2012*).

Digestión ácida

Los procedimientos de disolución con ácidos, incluida la digestión ácida convencional a presión atmosférica y la digestión ácida asistida por microondas, se han aplicado ampliamente para preparar muestras para el análisis elemental (*Alsaleh et al, 2018*). En general, los procedimientos de digestión ácida se utilizan para convertir muestras sólidas en extractos líquidos para cuantificar las concentraciones totales o pseudototales de elementos metálicos en los suelos (*da Silva et al, 2013*).

Disolventes

La digestión por vía húmeda generalmente implica el uso de ácidos inorgánicos concentrados para descomponer matrices orgánicas e inorgánicas (*Müller et al, 2014*). Con respecto a las muestras inorgánicas, los ácidos no oxidantes, como los ácidos clorhídrico y fluorhídrico, se pueden usar en combinación con ácido nítrico.

- Ácido nítrico

El ácido nítrico concentrado es el ácido que se usa más frecuentemente para la digestión de una gran variedad de muestras. El HNO_3 caliente es un agente oxidante fuerte. La temperatura de ebullición es relativamente baja. Este inconveniente puede eliminarse utilizando una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico. El uso de recipientes cerrados es otra alternativa para aumentar la temperatura de ebullición de la mezcla de digestión y mejorar la eficiencia de la digestión.

- Ácido clorhídrico

El ácido clorhídrico es un ácido no oxidante que presenta propiedades reductoras débiles y se utiliza con frecuencia para la descomposición de matrices inorgánicas. Disuelve carbonatos, fosfatos, boratos, sulfatos (excepto sulfato de bario) y óxidos metálicos. Sin embargo, la baja temperatura de ebullición del ácido clorhídrico limita su eficiencia de digestión, por lo que rara vez se utiliza solo. Se han reportado pérdidas por volatilización por formación de cloruros volátiles de elementos tales como As, Hg, Sb, Se y Sn en recipientes abiertos. Además, algunos elementos como Ag, Pb, Tl(I) o Hg(I) forman cloruros insolubles, por lo que no pasan a la disolución cuantitativamente.

- Ácido fluorhídrico

El ácido fluorhídrico es un ácido débil, pero se considera un reactivo químico importante en los procedimientos de digestión húmeda debido a la capacidad de complejación del ion fluoruro. El ácido fluorhídrico es muy eficaz para la descomposición de matrices de silicato por formación de SiF_4 . Para mejorar la descomposición de los compuestos inorgánicos, el ácido fluorhídrico se mezcla rutinariamente con otros ácidos, principalmente con ácido nítrico. El exceso de fluoruro debe eliminarse antes de analizar la muestra disuelta para evitar daños a los equipos de medida con componentes de cuarzo. Para ello se puede utilizar ácido ortobórico (H_3BO_3) que compleja el ión fluoruro, o bien se puede eliminar por volatilización en presencia de un exceso de ácido sulfúrico, nítrico o perclórico.

- Ácido perclórico

El ácido perclórico es uno de los ácidos minerales más fuertes y presenta un alto poder oxidante a altas temperaturas. Debe manejarse con extremo cuidado debido a su rápida reactividad y, a veces, puede volverse explosivo. El ácido perclórico se puede descomponer a $245\text{ }^\circ\text{C}$ en un recipiente cerrado de microondas y desarrollar cantidades peligrosas de subproductos gaseosos y exceso de presión. Por esta razón, el HClO_4 no debe usarse en recipientes cerrados.

- Ácido sulfúrico

El ácido sulfúrico concentrado es un fuerte reactivo deshidratante y tiene la temperatura de ebullición más alta de los ácidos minerales utilizados para la digestión. Por este motivo, es necesario un largo tiempo de evaporación para eliminar el exceso de ácido. Muchos procedimientos de digestión húmeda con recipientes abiertos emplean ácido sulfúrico para aumentar la temperatura de ebullición para evaporar los ácidos con una temperatura de ebullición más baja, como HNO_3 , HCl , HClO_4 o HF . La principal desventaja del empleo de ácido sulfúrico es la formación de sulfatos insolubles de elementos tales como Pb , Ag , Ba o Sr .

- Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se usa generalmente en combinación con otros ácidos como HNO_3 o H_2SO_4 para ayudar a disolver la materia orgánica. En el caso de suelos y sedimentos se utiliza en menor medida.

- Agua regia

Una mezcla de HCl concentrado y HNO_3 concentrado (volúmenes de 3:1) se denomina comúnmente "agua regia". Este reactivo tiene un efecto oxidante adicional por la formación de NOCl . La característica principal de esta mezcla es la capacidad de disolución de metales nobles, como Au , Ag y Pd . El método estándar *ISO 11466:1994* utiliza este disolvente para la extracción de elementos traza de los suelos.

Procedimientos de disolución

Varios métodos de digestión ácida para la determinación de metales pesados en suelos han sido descritos en la literatura.

- Ultrasonidos

El tratamiento de muestra asistido por ultrasonidos es una técnica prometedora para acelerar y simplificar el tratamiento de la muestra, con mínima contaminación, bajo consumo de reactivos y generación de residuos o desperdicios mínimos (*Kazi et al, 2009*).

- Autoclave

Se ha descrito la digestión de muestras de suelo en un autoclave con HF y HNO₃, pero este método parece no ser capaz de llevar a cabo la digestión cuantitativa pues los autores refieren recuperaciones inferiores al 30% (*Fedyunina et al, 2012*).

- *Digestión ácida en recipiente abierto*

Los procedimientos convencionales de disolución por vía húmeda implican el calentamiento de las muestras sólidas en un recipiente abierto en presencia de una mezcla de ácidos. Los procedimientos convencionales tienen la ventaja de no requerir dispositivos e instrumentos caros o sofisticados. Sin embargo, los procedimientos de digestión convencionales a menudo consumen mucho tiempo, incrementando el riesgo de pérdidas de elementos traza por volatilización. Debido a que los métodos convencionales se realizan en un sistema abierto con calefacción, existe el riesgo adicional de contaminación atmosférica y una amenaza importante para la salud de los técnicos de laboratorio debido a la liberación de gases tóxicos (*Alsaleh et al, 2018*).

- Digestión asistida por microondas

Los métodos de digestión asistida por microondas son muy rápidos y seguros porque se llevan a cabo en un sistema cerrado. Al calentar la mezcla de muestra y ácidos en un sistema, cerrado herméticamente, los gases producidos durante la digestión incrementan la presión en el interior del recipiente, con lo que la temperatura de ebullición aumenta y con ello la eficiencia del tratamiento. Además, se reduce la pérdida de componentes volátiles, el consumo de ácidos y el riesgo de contaminación. Se han desarrollado diferentes métodos de digestión asistida por microondas para proporcionar una descomposición efectiva de los metales (*Alsaleh et al, 2018*).

Se ha demostrado que los métodos de digestión ácida asistida por microondas son más apropiados para la digestión de materiales complejos como el suelo y los sedimentos que contienen óxidos, silicatos y material orgánico, producen resultados más reproducibles y precisos (*Krishna et al, 2009*), cercanos al 100% de la composición elemental total, dependiendo del componente estudiado, con la excepción de los metales asociados con los silicatos. Por lo tanto, los métodos de digestión parcial que usan ácidos se consideran apropiados para el análisis pseudototal, pero no disuelven completamente los silicatos (*Alsaleh et al, 2018*). Solo los métodos que incluyen el uso de ácido fluorhídrico son capaces de extraer los contenidos totales de elementos traza.

Métodos estandarizados para disolución de muestras de suelo

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha publicado los métodos EPA 3050B, 3051, 3051A y 3052 para la digestión ácida de muestras de suelo, sedimentos y lodos para extraer elementos traza que posteriormente se analizan por AAS, ICP OES e ICP-MS. La mayoría de los métodos de la USEPA no consiguen la descomposición total de la muestra; solo el método EPA 3052 asistido por microondas en presencia de ácido fluorhídrico (HF) permite una digestión total (*da Silva et al, 2013; de Carvalho et al, 2015; Chen y Ma, 1998*).

El método EPA 3050B se considera un procedimiento convencional porque se realiza en un sistema abierto, en el que los elementos en la fase sólida se extraen mediante una fuente de calor en presencia de ácidos nítrico y clorhídrico. Este método puede provocar la pérdida de elementos más volátiles, como el Hg (*da Silva et al, 2013*). Además, las variaciones en las temperaturas de la placa calefactora, los tiempos de reflujos y las adiciones de ácido afectan directamente las recuperaciones de los elementos (*Chen y Ma, 1998*).

El método EPA 3051 es una alternativa al método 3050B, y consiste en una digestión asistida por microondas con ácido nítrico. Esta técnica proporciona una digestión rápida, segura y eficiente y es menos susceptible de sufrir pérdidas de elementos volátiles (*Chen y Ma, 1998*).

El método EPA 3051A es una modificación del método 3051 para imitar el método 3050B, que requiere el uso conjunto de ácido clorhídrico y ácido nítrico para mejorar la recuperación de Ag, Al, Fe y Sb. Realizado en un sistema cerrado de microondas, este método proporciona una mayor temperatura y presión, lo que resulta en una digestión más rápida, segura y eficiente, además de ser menos susceptible a la pérdida de elementos volátiles (*da Silva et al, 2013; Chen y Ma, 1998*).

No obstante, ninguno de estos métodos de referencia consigue la disolución total de la muestra de suelo/sedimento. En estudios comparativos descritos en la literatura se obtuvieron mayores recuperaciones para la mayoría de los elementos, y las desviaciones estándar resultantes fueron menores, utilizando el método de descomposición total (método EPA 3052) que cuando se usaron métodos de digestión parcial (3050B, 3051, 3051A).

En el método EPA 3052, una muestra representativa se digiere, en un horno de microondas, con una mezcla de ácido nítrico y ácido fluorhídrico. El método ofrece varias combinaciones alternativas de ácidos y reactivos, incluyendo ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno. Las muestras con concentraciones más altas de dióxido de silicio pueden requerir concentraciones más altas de ácido fluorhídrico. La adición de ácido clorhídrico concentrado es apropiada para la estabilización de Ag, Ba, Sb y de altas concentraciones de Fe y Al.

Para eliminar el exceso de HF se suele emplear ácido ortobórico con objeto de complejar el fluoruro y evitar que ataque los componentes de cuarzo de los espectrómetros. Algunos autores recomiendan calentar nuevamente las muestras en el horno de microondas tras la adición del ácido bórico (*Abollino et al, 2002; Ardini et al, 2010; de Carvalho et al, 2015; Betinelli et al, 2000*). Muchos autores han descrito que la presencia de ácido bórico aumenta el ruido de fondo y disminuye la sensibilidad analítica para muchos elementos determinados por ICP-OES e ICP-MS debido al elevado contenido salino (*Chen y Ma, 1998*). Alternativamente, se pueden emplear antorchas de ICP resistentes al ácido fluorhídrico.

Otra opción es la eliminación del exceso de HF por evaporación hasta casi sequedad en presencia de ácidos inorgánicos con mayores puntos de ebullición, como nítrico, sulfúrico o perclórico. El residuo se redisuelve finalmente.

En todos los casos, la disolución final debe contener ácido nítrico al 2% para garantizar la estabilidad de los elementos metálicos extraídos.

A pesar de la gran cantidad de publicaciones sobre la digestión de muestras de rocas, suelos y sedimentos, existen conclusiones diferentes y, a veces, contradictorias sobre la eficiencia de los métodos. Cada autor propone condiciones experimentales diferentes (*Betinelli et al, 2000; Cave y Harmon, 1997; Frémion et al, 2017; Güven y Akinci, 2011; Hseu et al, 2002; Moor et al, 2001; Rospabe et al, 2018; Sandroni et al, 2003*) y no hay consenso en cuál sería el mejor procedimiento

de disolución completa de muestras de suelo y sedimentos con vistas al análisis de elementos traza por ICP-MS.

Por ello, en este trabajo se va a optimizar un método de digestión para muestras de suelo, partiendo del método de referencia USEPA 3052.

1.4 Optimización mediante diseños experimentales.

Tradicionalmente, la optimización se ha realizado mediante el método de ensayar "un factor a la vez", que consiste en realizar la experimentación cambiando un solo factor permaneciendo el resto en unos valores constantes. Esta metodología exige realizar muchos ensayos y por ende es incapaz de alcanzar el óptimo al no tener en cuenta posibles interacciones entre factores. Los métodos de optimización basados en el uso de diseños de experimentos (*design of experiments*, DOE) consiguen hallar la combinación óptima de los niveles de los factores con un menor número de experimentos, evaluar las interacciones entre factores y estimar además el grado de contribución de cada factor a la respuesta, permitiendo identificar los factores críticos.

El diseño de experimentos consiste en realizar ensayos en los que se introducen cambios deliberados en los valores o niveles de los factores, de acuerdo a un patrón específico definido por el diseño empleado. El análisis de varianza de los resultados de los experimentos realizados permite identificar los factores ensayados que ejercen un efecto significativo en la respuesta, para después identificar el nivel o valor del factor influyente que produce la respuesta óptima del sistema.

Entre los diseños de experimentos más populares cabe destacar: diseños factoriales completos y fraccionales, de superficie de respuesta, de Plackett & Burman, de bloques aleatorios, de cuadrado latino y grecolatino, y los arreglos ortogonales de Taguchi (*Box et al., 1978; Ross, 1988; Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2012; Dean et al., 2017*).

Para estudiar la manera en la que influye cada factor sobre la variable de respuesta, es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos. Con el diseño factorial completo se realizan aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar.

Cuando crece el número de factores también aumenta rápidamente el número de experimentos en los diseños factoriales completos. Para experimentar con esta cantidad de factores se requiere una estrategia que permita reducir el número de experimentos, pero que al mismo tiempo se pierda el mínimo de información valiosa. Tal estrategia la conforman los diseños factoriales fraccionados, los cuales, gracias al exceso de información que acumulan los diseños factoriales completos cuando se estudian muchos factores, permiten sacrificar información poco importante para conseguir un diseño manejable en cuanto al número de experimentos. La teoría de diseños fraccionados se basa en una jerarquización de los efectos: son más importantes los efectos principales, seguidos por las interacciones dobles, luego las triples, cuádruples, etc. (*Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2012*).

El diseño de parámetros de Taguchi es especialmente ventajoso porque usa diseños factoriales ortogonales, permitiendo estudiar el efecto sobre la respuesta de un elevado número de factores con un mínimo número de experimentos. Otra ventaja del diseño de parámetros de Taguchi es que es un diseño robusto, esto es, introduce deliberadamente en la experimentación variaciones de factores que, en la práctica, no pueden ser controlados (factores de ruido) con objeto de hallar

las condiciones que minimizan su efecto, obteniendo un óptimo robusto frente a ese ruido. (Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar, 2012; Vega, 1992).

La ortogonalidad de la matriz experimental de los diseños de Taguchi permite separar el efecto de cada factor e interacción, y de sus interacciones con el factor de ruido si este se ha introducido en la experimentación, permitiendo la optimización de los factores de control y la reducción de la variabilidad del proceso.

Tras identificar mediante ANOVA los factores con un efecto significativo en la respuesta, se aplica una prueba de significación post hoc, como la prueba del rango múltiple de Duncan, para identificar el nivel del factor que proporciona una respuesta óptima significativamente diferente (Ross, 1988).

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

La determinación de elementos traza en suelos y sedimentos tiene interés, tanto desde el punto de vista medioambiental, para evaluar el riesgo ecotóxico de esos materiales, como desde una perspectiva económica, relacionada con las necesidades de fertilización de los suelos para mejorar el rendimiento de las explotaciones agrícolas, o con la posible explotación para obtener minerales de interés industrial y tecnológico.

Es necesario disponer de métodos de análisis sensibles, rápidos y eficientes, que permitan la determinación precisa y veraz de los contenidos totales de todos los elementos traza de interés en matrices complejas.

Para extraer los contenidos totales de elementos traza de suelos y sedimentos las muestras son habitualmente tratadas con ácidos oxidantes (como el ácido nítrico), acompañados de ácido fluorhídrico y/o ácido clorhídrico. En la literatura no hay consenso respecto a las cantidades de reactivos a emplear, tiempos y temperaturas de digestión y método de eliminación del exceso de ácido fluorhídrico, que debe ser eliminado porque produce serios daños en las piezas de cuarzo de los instrumentos de medida. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es la optimización de un procedimiento para la disolución cuantitativa de muestras de suelo para determinar las concentraciones totales de elementos traza (metales pesados, metaloides tóxicos y tierras raras) por ICP-MS. Los factores a optimizar serán las cantidades de ácidos nítrico, fluorhídrico y clorhídrico empleadas en la disolución, el tiempo y temperatura del horno microondas durante la digestión, y el método de eliminación del exceso de ácido fluorhídrico.

La optimización se va a llevar a cabo empleando como diseño experimental un arreglo ortogonal $L_{27}(3^{13})$ de Taguchi que, con solo 27 experimentos, permite ensayar hasta 13 factores a 3 niveles. Las columnas no utilizadas del arreglo ortogonal se emplearán para evaluar interacciones entre factores.

La respuesta buscada es conseguir la disolución completa de las muestras de suelo para maximizar la recuperación de elementos traza. Para verificar que se han recuperado los elementos cuantitativamente se realizarán los experimentos sobre una muestra de suelo con contenidos certificados de diversos elementos traza, representativos de grupos con diferentes características y reactividad. A partir de las concentraciones determinadas por ICP-MS en los extractos, se calculará el porcentaje de cada elemento recuperado y el sesgo relativo. El objetivo será hallar las condiciones experimentales óptimas que minimicen dicho sesgo.

Mediante el análisis de varianza de los resultados del diseño experimental, se identificarán los factores más influyentes. Los niveles que optimizan la respuesta perseguida se identificarán mediante el test de recorrido múltiple de Duncan.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Material de referencia certificado

Todos los experimentos se llevaron a cabo con una muestra de suelo de control (material de referencia certificado CRM GBW07402 GSS-2, suministrado por el *Institute of Geophysical and Geochemical Exploration*, Langfang, China). Los contenidos certificados de los elementos que se estudiaron en este trabajo y sus incertidumbres, expresadas como incertidumbre expandida con un factor de cobertura $K=2$, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores certificados e incertidumbres.

Elemento	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
μ_0 (mg/Kg)	13,7	1,8	43,5	47,0	4,9	16,3	4,4	12,0	19,4	20,0	1,3	3,0	16,6	0,6	1,4	22,0	42,0
U (mg/kg)	1,2	0,2	0,9	4,0	0,5	0,9	0,3	1,0	1,3	3,0	0,2	0,3	0,8	0,2	0,3	2,0	3,0

Reactivos e instrumentación

Los reactivos empleados fueron: ácido nítrico del 65% (Scharlab), ácido fluorhídrico del 48% (Panreac), ácido clorhídrico del 37% (Scharlab) y ácido ortobórico del 99,8% (Panreac). Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. Las disoluciones se prepararon con agua desionizada de conductividad máxima $18 \mu\text{S}/\text{cm}$.

La digestión del suelo se realizó en un horno de microondas Milestone ETHOS PLUS, controlado con un LabTerminal 800 Controller. Las muestras y los reactivos se depositaron en recipientes de PTFE de 50 mL de capacidad aptos para dicho microondas, encamisados para asegurar un cierre hermético, y colocados en un soporte rotatorio. En uno de los vasos de muestra se introdujo una sonda de temperatura para controlar ésta durante el proceso de digestión.



Imagen 1. Recipientes de PTFE (izda.) y camisas y soporte rotatorio (drcha.) para la digestión en horno de microondas



Imagen 2. Horno microondas (izda.) y unidad de control (drcha.)

Los elementos traza seleccionados fueron cuantificados en un espectrómetro de masas por plasma acoplado inductivamente, ICP-MS (Agilent 7500c), equipado con una celda de colisión ORS (*Octopole Reaction System*) y con un automuestreador integrado Agilent G3160A.



Imagen 3. Equipo ICP-MS



Imagen 4. Automuestreador (izda.), antorcha e interfase (drcha.)

La eliminación del exceso de ácido fluorhídrico por evaporación se llevó a cabo en vasos de PTFE de 50 mL de capacidad colocados sobre un baño de arena sin control de temperatura, calentado a potencia baja para evitar el sobrecalentamiento de los vasos.



Imagen 5. Baño de arena

3.2 Elección de los metales

Con objeto de minimizar en lo posible el coste del análisis por ICP-MS, y maximizar la información generada por el diseño experimental relativa al efecto de las condiciones de disolución del suelo sobre la extracción de elementos traza, se seleccionaron 17 elementos traza representativos.

Los elementos se han elegido para representar grupos con diferentes características o reactividad: elementos tóxicos presentes en suelos agrícolas, como As o Pb; elementos formadores de cloruros, como Sb o Sn; elementos muy insolubles, como Th; elementos traza más abundantes, como Zn; elementos ligeros, como Be; elementos volatilizables, como Cr; tierras raras, como Dy. Otros criterios a la hora de seleccionar los 17 elementos fueron que su contenido estuviese certificado en el CRM, que no sean elementos usados como estándar interno en ICP-MS, y que su concentración fuese lo suficientemente elevada para que, una vez disuelto, la concentración estuviese muy por encima del límite de detección para asegurar una determinación precisa. Los 17 metales elegidos, ordenados alfabéticamente, fueron: As, Be, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Ga, Ni, Pb, Sb, Sn, Th, Tl, U, Y, Zn.

Con esto se pretende que los resultados de la optimización puedan extrapolarse al resto de los elementos traza.

3.3 Diseño de experimentos

Como ya se ha mencionado anteriormente, en este trabajo se va a utilizar un diseño experimental de Taguchi para optimizar la digestión asistida por microondas de muestras de suelo y sedimentos.

En el diseño de Taguchi se utilizan arreglos ortogonales para diseñar la experimentación en lugar de diseños factoriales completos. Uno de los inconvenientes de los diseños factoriales

completos es que, cuando el número de factores es elevado, el número de experimentos a realizar aumenta exponencialmente (a^k experimentos, donde k es el número de factores y a el número de niveles por factor) y aproximadamente el 80% de la información que proporciona se desperdicia. Al trabajar con arreglos ortogonales se obtiene la misma información útil, pero disminuyendo drásticamente la experimentación.

Los arreglos ortogonales se designan mediante la simbología $L_a(b^c)$ donde L significa que las columnas de la matriz son linealmente independientes, a es el número de experimentos, b el número de niveles de cada factor y c el número de factores que se pueden estudiar con esos a experimentos.

Una vez definido el problema analítico (disolver cuantitativamente la muestra de suelo) y la respuesta a optimizar (minimizar el sesgo relativo), los pasos principales para implementar el diseño experimental de Taguchi son (Vega et al, 1994; Barrado et al, 1996):

1. Identificar los factores y sus potenciales interacciones que afectan a la respuesta a optimizarla variable y elegir los niveles a ensayar.
2. Seleccionar la matriz ortogonal adecuada.
3. Asignar factores e interacciones a las columnas de la matriz.
4. Realizar los experimentos.
5. Llevar a cabo un análisis estadístico de los datos para identificar los factores más influyentes y determinar sus niveles óptimos.

Selección de factores, niveles e interacciones

Factor es toda aquella variable que puede afectar a la respuesta que se quiere optimizar. Los factores que se cree que pueden influir en la digestión pueden ser de varios tipos:

Factores fijos, que no se pueden o no se desean modificar: cantidad de muestra, número y posición de muestras en el horno microondas, parámetros del ICP (es un equipo de un laboratorio central que aplica procedimientos de rutina), procedimiento de filtración, volumen final, cantidad ácido bórico, etc.

Factores de control, sobre los cuales podemos actuar y fijar su valor: Volumen de ácido nítrico (N), volumen de ácido clorhídrico (C), volumen de ácido fluorhídrico (F), temperatura del horno microondas (T), tiempo de digestión (t) y método de eliminación del exceso de ácido fluorhídrico (E).

Los niveles son los valores que se dan a los factores que actúan sobre la variable a optimizar. Como no conocemos la relación entre los factores y la respuesta se elegirán varios niveles por factor. Si se eligen solo 2 niveles por factor, estaríamos suponiendo una relación lineal, y si el valor óptimo estuviera entre ambos niveles no seríamos capaces de identificarlo. Si se eligen 3 niveles por factor, seríamos capaces de detectar efectos cuadráticos. Por el contrario, si se elige un número mayor de niveles aumentaría mucho la cantidad de experimentos a realizar. Por tanto es necesario alcanzar un compromiso para obtener suficiente información con la mínima experimentación. Por todo esto, se ha decidido ensayar cada factor de control a tres niveles.

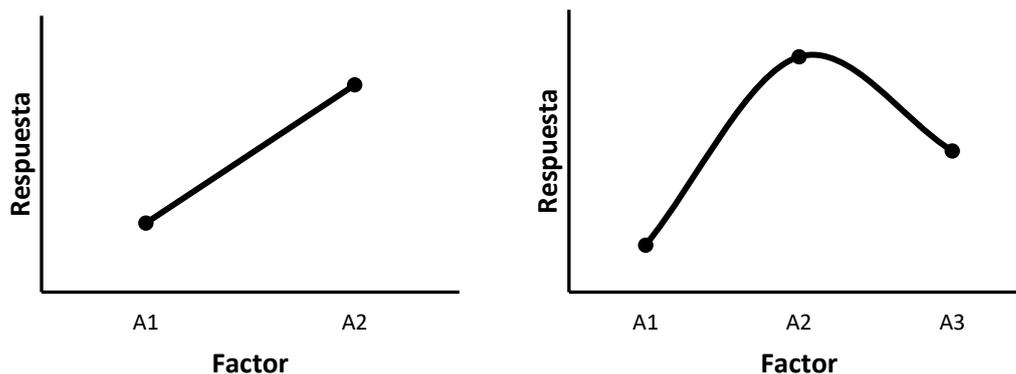
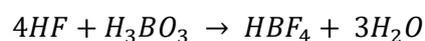
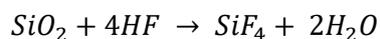


Figura 1. Relación entre la respuesta obtenida y el número de niveles de un factor

Los niveles de los factores a ensayar se eligieron a partir de las recomendaciones del método EPA 3052 y de la literatura consultada. La Tabla 2 resume las condiciones experimentales empleadas en diversos estudios realizados de disolución de muestras de suelo asistida por microondas.

La cantidad de ácido ortobórico constante añadida es la suficiente para neutralizar todo el ácido fluorhídrico añadido (en el nivel más alto), para así no correr el riesgo de dañar los componentes de cuarzo del ICP-MS. Para calcular dicha cantidad se ha tenido en cuenta la estequiometría de las reacciones de disolución del silicato y de complejación del exceso de HF.



Del balance de materia en la situación más desfavorable se dedujo la cantidad necesaria de ácido ortobórico a emplear: 35 mL de disolución al 4%. Cuando el método de eliminación implicaba un nuevo calentamiento de la muestra en el microondas, dado que la capacidad del recipiente impedía el uso de grandes volúmenes, se añadió la cantidad equivalente en forma sólida (1,4 g).

La Tabla 3 muestra los factores de control investigados y los niveles de cada factor seleccionados.

Se pueden producir interacciones entre los factores de control. En los diseños de Taguchi, para estudiar interacciones entre factores de control deben asignarse columnas del arreglo ortogonal a priori. En nuestro caso hemos considerado la posibilidad de interacciones entre los factores temperatura, cantidad de HF empleada, y método de eliminación de su exceso, TxF, FxE y TxE. Estas interacciones se han asignado a columnas del arreglo ortogonal.

Tabla 2. Revisión bibliográfica sobre disolución de muestras de suelo en horno microondas

REFERENCIA	MUESTRA (g)	DIGESTION ACIDA					TEMPERATURA	TIEMPO (min)	ELIMINACION HF
		HNO ₃ (ml)	HCl (ml)	HF (ml)	OTROS				
<i>USEPA 3052, 1996</i>	0,5	9		3			180°C	5,5(r) + 9,5	Disolución saturada H ₃ BO ₃ o llevar a sequedad y redisolver en HNO ₃
		9	2/4	0/5					
<i>Geana et al, 2011</i>	0,25	3		1		200°C	6(r) + 20	-	
		3	0,7	1					
<i>Abollino et al, 2002</i>	0,1	5 ml agua regia		2		250, 400, 600, 250 W	5 + 5 + 5 + 5	0,7 g H ₃ BO ₃ + 5 min 250 W	
<i>Güven y Akinci 2011</i>	0,1	3		1		200, 400, 600 W	8 + 7 + 1	-	
	0,1	3	0,8	1		200, 400, 600 W	8 + 7 + 1	-	
	0,1	3	0,8	1		200, 400, 600 W	8 + 6 + 2	-	
<i>de Carvalho et al, 2015</i>	0,1	4	1	0,5		85, 150, 210 °C	2,5(r) + 4(r) + 5(r) + 20	4 ml disolución saturada H ₃ BO ₃ y se repite el programa MW	
<i>Bettinelli et al, 2000</i>	0,25	8 ml agua regia				250, 400, 500, 250, 400, 600 W	2 + 2 + 10 + 8 + 4 + 6	-	
	0,25	2	6	2		250, 400, 500, 250, 400, 600 W	2 + 2 + 10 + 8 + 4 + 6	2 ml disolución saturada H ₃ BO ₃ + 3 min 300 W	
<i>Krishna et al, 2009</i>	0,05	3	1	6		150, 180, 200°C	10(r) + 2 + 15(r) + 2 + 15(r) + 2	1 ml HClO ₄ , llevar a sequedad y redisolver en HNO ₃	
<i>Müller et al, 2014</i>	0,3	2	6	1	1 ml H ₂ O ₂	200°	25	-	
		2	6		1 ml H ₂ O ₂				
		2	6	2					
		2	6						
	0,1	10				230°	40	-	
		9	1						
		8	1	1					
	0,5	3	9			175°	23	-	
	0,25	2,5	7,5			200°	25	-	
	0,5	3,5	9,5			160°	25	-	
0,15	1	3	0,15		175°	20	-		
0,1	3		6	1 ml H ₂ O ₂	800W	12	-		
0,25	2,5		2,5		500W	15	-		
<i>Fedyunia et al, 2012</i>	0,05	7		3		210°	30(r) + 30	Llevar a sequedad 2 veces y redisolver en HNO ₃	
<i>Frémion et al, 2017</i>	0,25	5	2	1		180° C	60	6 ml disolución saturada H ₃ BO ₃	
<i>Gallo et al, 2018</i>	0,2	5ml agua regia			1			1 ml disolución saturada H ₃ BO ₃	
<i>Sandroni et al, 2003</i>	0,025	4		0,2	4ml agua	400, 1000 W	6 + 15	-	
						250, 450, 650 W	2 + 4 + 30		
<i>Moor et al, 2001</i>	0,2	4		0,5		400W	40(r)	-	

(r) tiempo de rampa para alcanzar la temperatura indicada

Tabla 3. Factores y sus respectivos niveles

Factores control	Uds	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
N	mL	3	4,5	6
C	mL	0	1	2
F	mL	1	2	3
t	min	10	15	20
T	°C	180	190	200
E	Adim	A-H ₃ BO ₃	B-Evap HNO ₃	C-H ₃ BO ₃ + MW

Elección de la matriz del diseño y asignación de las columnas

La elección del diseño depende del número de factores y de niveles que se van a estudiar, en nuestro caso tenemos 6 factores que se van a ensayar a 3 niveles cada uno. La matriz del diseño es una tabla que contiene las combinaciones de los niveles de los factores para cada uno de los experimentos a realizar.

El diseño que se adapte al problema ha de ser el que, teniendo el mínimo número de experimentos, contenga al menos tantos grados de libertad como el sistema a estudiar.

El número de grados de libertad de un sistema es la suma de los grados de libertad de los factores por los que se ve afectado. Para cada factor coincide con el número de niveles ensayados menos uno. Por lo que en nuestro caso:

$$\text{g.d.l} = 6 \text{ factores} \times (3 \text{ niveles} - 1) = 12$$

Los posibles arreglos para un sistema con 6 factores a 3 niveles y 12 grados de libertad son $L_{27}(3^{13})$ y $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ (arreglo mixto).

Cada una de las tres interacciones que deseamos estudiar conlleva $(3-1) \times (3-1) = 4$ g.d.l. adicionales, por lo que el arreglo finalmente empleado deberá contener un mínimo de 24 g.d.l. Por tanto, finalmente se ha elegido el diseño $L_{27}(3^{13})$, que implica la realización de 27 experimentos, que se convierten en 54 al realizarse por duplicado para poder estimar el error residual o aleatorio.

A pesar de tener que realizar 54 experimentos, la disminución de experimentación que conlleva utilizar un diseño de Taguchi es clara si se tiene en cuenta que para estudiar los efectos de los 6 factores a 3 niveles con un diseño factorial completo serían necesarios $3^6 = 729$ experimentos, 1458 si se realizan por duplicado.

La gráfica factorial mostrada en la Figura 2 indica cómo deben asignarse factores y sus interacciones a las columnas del arreglo ortogonal L_{27} . Los números simbolizan las columnas del arreglo ortogonal.

La Tabla 4 muestra la matriz del diseño experimental con las combinaciones de los niveles de los factores a emplear en cada uno de los 27 experimentos. La columna 13 quedó libre y la varianza que contiene se mezclará con el error residual.

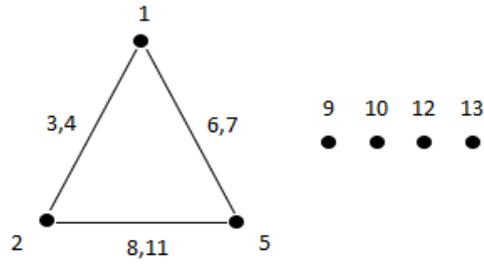


Figura 2. Gráficas factoriales (Ross, 1988)

Tabla 4. Matriz del diseño $L_{27}(3^{13})$ (Ross, 1988)

Exp	Factor asociado a cada columna												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	F	T	FxT	FxT	E	FxE	FxE	TxE	C	t	TxE	N	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2

3.4 Procedimiento analítico

Para cada una de las 27 combinaciones experimentales de factores a ensayar se realizaron dos réplicas y un blanco de digestión. A pesar de disponer de 6 compartimentos de muestra en el horno microondas, solo se ocupan 3 debido a que para cada experimento se añade una cantidad de ácidos distinta, lo que conlleva un volumen y una composición diferente y ello se traduce en que una vez dentro del microondas no todos los recipientes alcanzarán la misma temperatura dado que la sonda de control solo se instala en uno de los vasos.

Tabla 5. Combinación de niveles de los factores en cada uno de los experimentos

Experimento	F	T	E	C	t	N
1	1	180	A	0	10	3
2	1	180	B	1	15	4,5
3	1	180	C	2	20	6
4	1	190	A	1	15	6
5	1	190	B	2	20	3
6	1	190	C	0	10	4,5
7	1	200	A	2	20	4,5
8	1	200	B	0	10	6
9	1	200	C	1	15	3
10	2	180	A	1	20	4,5
11	2	180	B	2	10	6
12	2	180	C	0	15	3
13	2	190	A	2	10	3
14	2	190	B	0	15	4,5
15	2	190	C	1	20	6
16	2	200	A	0	15	6
17	2	200	B	1	20	3
18	2	200	C	2	10	4,5
19	3	180	A	2	15	6
20	3	180	B	0	20	3
21	3	180	C	1	10	4,5
22	3	190	A	0	20	4,5
23	3	190	B	1	10	6
24	3	190	C	2	15	3
25	3	200	A	1	10	3
26	3	200	B	2	15	4,5
27	3	200	C	0	20	6

Digestión

Se pesan 0.25 g del CRM con precisión 0.0001 g en los recipientes de PTFE aptos para el microondas, limpios y secos. Con una micropipeta de 5 mL se añaden los volúmenes necesarios en cada caso de ácido nítrico (3, 4,5 o 6 mL), clorhídrico (0, 1 o 2 mL) y fluorhídrico (1, 2 o 3 mL), arrastrando todas las partículas de sedimento que puedan haber quedado adheridas a las paredes del recipiente. Se cierran los recipientes y se introducen en el horno microondas, programando la temperatura (180, 190 o 200°C), el tiempo (10, 15 o 20 minutos), una rampa para alcanzar la temperatura de 5 minutos y una etapa de ventilación final de 45 minutos. Se espera hasta que la temperatura en el interior de los recipientes descienda por debajo de 35°C.

Eliminación del exceso de HF

Método A: Se sacan los recipientes del microondas y se abren dentro de la vitrina. Se añade a cada uno 35 mL de ácido ortobórico al 4%. Se mezcla cuidadosamente y se deja reposar unos minutos para que la reacción se complete, tras lo cual se transfiere cuantitativamente el contenido a matraces aforados de 50 mL y se enrasa con agua desionizada. Se homogeneiza el contenido del matraz, se filtra a través de filtros de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se guarda en tubos de plástico de 50 mL de capacidad.

Método B: Una vez completada la digestión, se transfieren las disoluciones de forma cuantitativa a vasos de PTFE de 50 mL, que se colocan en la superficie de un baño de arena a potencia mínima hasta casi sequedad; entonces se redisuelve el residuo con 25 mL de una disolución de ácido nítrico al 4%, para conseguir una concentración final de ácido del 2%. Estas disoluciones se enrasan a 50 mL con agua desionizada en matraces y se filtra finalmente como ya se ha descrito.

Método C: A cada muestra digerida se añaden 1,4 g de ácido ortobórico sólido, se vuelven a tapar los recipientes y se introducen de nuevo en el sistema microondas, se calienta 5 minutos a 180°C, con una rampa para alcanzar la temperatura de 5 minutos y una etapa de ventilación de 45 minutos. Una vez fríos, los contenidos de los recipientes se transfieren a los matraces aforados, se enrasa y se filtra.

Los extractos ácidos filtrados se conservaron refrigerados a 4°C hasta su determinación por ICP-MS.

Determinación de elementos traza por ICP-MS

El equipo fue calibrado con patrones preparados por dilución de una disolución multipatrón y patrones unielementales comerciales de 1000 ppm.

Los patrones de calibración y las muestras digeridas se midieron por ICP-MS en comparación con los estándares internos adecuados para mejorar la precisión.

En la Tabla 6 se muestran las relaciones m/z de los elementos determinados, el estándar interno utilizado para cada uno de ellos y si se utilizó la celda de reacción.

Tabla 6. Elementos medidos por ICP-MS y condiciones de la medición

Elemento	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
m/z	75	9	59	53	133	63	163	71	60	208	121	118	232	205	238	89	66
Patron interno	Ge	In	Ge	In	Tb	Ge	Tb	Ge	Ge	Lu	In	In	Lu	Lu	Lu	In	Tb
Celda de reaccion	sí	no	sí	no	no	sí	no	sí	sí	no	no	no	no	no	no	no	no

La bomba del nebulizador tenía una velocidad de 0,15 rps, la potencia de la radiofrecuencia empleada para generar el plasma fue de 1380W, el flujo de gas portador fue de 1,28 L Ar/min, la interfase es de Cu/Ni, y en la celda de colisión el flujo de gas fue 3,5 mL He/min.

Para validar los resultados analíticos, cada 10 muestras se midió un blanco instrumental (disolución de ácido nítrico), una disolución de control con contenidos certificados de algunos de los elementos (TM-25.6, lote 0918, *Environment and Climate Change*, Canada) y un control interno con concentración exactamente conocida (25 ppm) de los elementos de interés. Cuando los resultados de estas muestras de control difieren más de un 15% del valor esperado, el instrumento se recalibra y las muestras se vuelven a medir.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados experimentales

La Tabla 7 recoge los resultados analíticos, en mg por kg de suelo, de los 17 elementos determinados en las disoluciones procedentes de cada uno de los 27 experimentos realizados por duplicado. A los resultados mostrados se les ha restado ya el correspondiente blanco.

Se han cuantificado los elementos en las disoluciones tanto por el método del calibrado externo, como empleando el método del patrón interno. Solo se muestran los obtenidos con patrón interno ya que son significativamente mejores.

En la Figura 3 se han representado los resultados experimentales, para cada elemento y combinación de factores del diseño experimental, junto con el valor certificado (valores numéricos en Tabla 1). Las dos barras verticales representan las dos réplicas de cada experimento, y la línea horizontal el valor certificado. De este modo se facilita la visualización tanto de la repetibilidad de los resultados como las recuperaciones de metales en cada experimento.

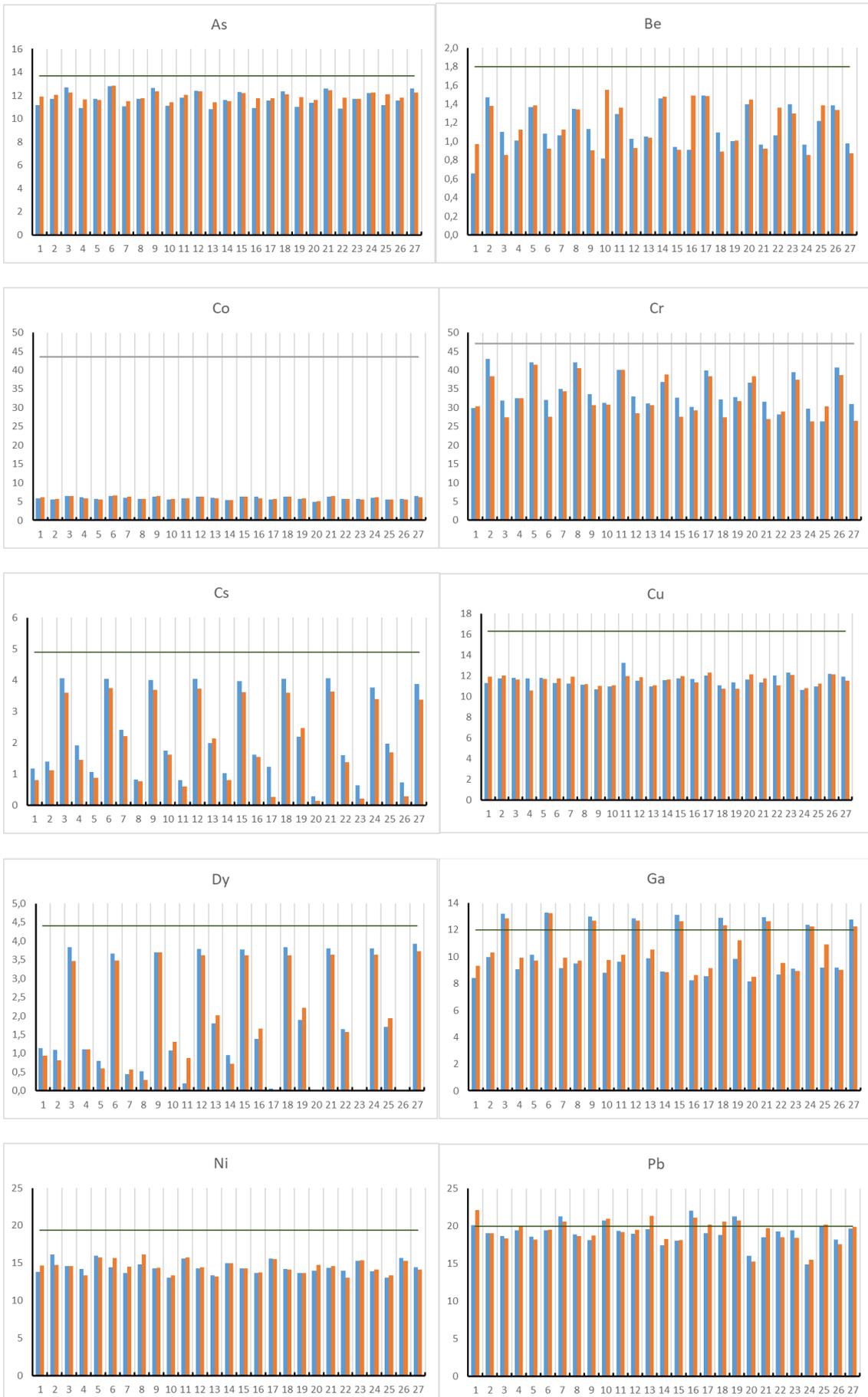
Se observa que, en general, los resultados son bastante reproducibles. No obstante, en el caso del elemento más ligero, Be, los resultados obtenidos son poco reproducibles.

En cuanto a la recuperación, se observa que varía notablemente con las condiciones experimentales en la mayoría de los casos. De especial relevancia es el efecto de las condiciones de disolución sobre la extracción de los elementos Cr, Cs, Dy, Ga, Th e Y. Los elementos con mejores recuperaciones son el As, Pb y Sb. El talio no se extrae bien en ninguno de los experimentos.

La recuperación de Co es anormalmente baja. Dado que química y espectroscópicamente este bajo resultado es difícil de explicar, hemos procedido a analizar la muestra de suelo CRM por fluorescencia de rayos X, XRF, para comparar los resultados de ambas técnicas de análisis. La Tabla 8 es una comparativa de los valores de referencia del CRM para los 17 elementos, los resultados medios de los 54 experimentos y el resultado obtenido por XRF.

Tabla 7. Datos experimentales, en mg de elemento por kg de suelo

Exp	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
1	11,2	0,7	5,9	29,9	1,2	11,3	1,1	8,4	13,8	20,1	1,2	2,0	3,9	0,2	0,5	4,6	38,1
	11,9	1,0	6,2	30,3	0,8	11,9	0,9	9,3	14,7	22,1	1,4	1,9	4,2	0,2	0,8	3,3	29,8
2	11,7	1,5	5,6	43,0	1,4	11,7	1,1	10,0	16,2	19,1	1,5	2,1	2,5	0,2	1,1	3,3	40,3
	12,0	1,4	5,6	38,4	1,1	12,0	0,8	10,3	14,8	19,1	1,4	1,9	2,0	0,2	1,1	2,0	48,3
3	12,7	1,1	6,5	32,0	4,1	11,8	3,8	13,2	14,6	18,7	1,4	2,5	16,6	0,2	1,4	18,6	25,5
	12,2	0,9	6,4	27,4	3,6	11,6	3,5	12,9	14,6	18,3	1,4	2,3	16,0	0,2	1,4	16,3	23,6
4	10,9	1,0	6,2	32,6	1,9	11,7	1,1	9,1	14,2	19,5	1,2	2,1	3,1	0,2	1,3	5,1	30,2
	11,6	1,1	5,9	32,6	1,5	10,6	1,1	9,9	13,4	20,1	1,5	2,1	4,0	0,1	1,3	4,6	34,0
5	11,7	1,4	5,7	42,0	1,1	11,8	0,8	10,2	16,0	18,6	1,4	2,0	1,5	0,2	1,1	2,1	35,2
	11,6	1,4	5,6	41,5	0,9	11,7	0,6	9,7	15,8	18,2	1,3	2,0	0,9	0,2	1,1	1,5	33,5
6	12,8	1,1	6,4	32,0	4,0	11,3	3,7	13,3	14,4	19,5	1,5	2,2	16,3	0,2	1,4	17,4	34,9
	12,8	0,9	6,7	27,5	3,7	11,7	3,5	13,2	15,6	19,5	1,5	2,0	16,4	0,2	1,3	15,9	28,6
7	11,1	1,1	6,0	35,0	2,4	11,2	0,4	9,2	13,7	21,3	1,2	2,3	0,9	0,2	1,4	1,6	36,0
	11,5	1,1	6,3	34,4	2,2	11,9	0,6	9,9	14,5	20,6	1,5	2,3	1,4	0,1	1,5	2,0	32,4
8	11,7	1,3	5,7	42,1	0,8	11,1	0,5	9,5	14,9	18,9	1,4	1,9	0,6	0,2	1,1	1,1	36,5
	11,8	1,3	5,7	40,6	0,8	11,2	0,3	9,7	16,1	18,6	1,3	1,7	0,4	0,2	1,1	0,5	33,2
9	12,6	1,1	6,4	33,6	4,0	10,7	3,7	13,0	14,3	18,2	1,5	2,3	15,4	0,2	1,4	17,7	28,4
	12,3	0,9	6,5	30,7	3,7	11,0	3,7	12,7	14,4	18,8	1,6	2,4	16,5	0,2	1,4	18,0	25,7
10	11,1	0,8	5,6	31,3	1,7	10,9	1,1	8,8	13,1	20,8	1,3	2,4	4,5	0,2	0,9	4,8	32,7
	11,4	1,6	5,7	30,8	1,6	11,1	1,3	9,7	13,3	21,0	1,3	2,4	6,4	0,2	1,0	5,8	31,9
11	11,8	1,3	5,9	40,1	0,8	13,2	0,2	9,6	15,6	19,3	1,4	2,0	0,8	0,2	0,9	0,4	37,9
	12,1	1,4	5,8	40,1	0,6	12,0	0,9	10,1	15,8	19,2	1,4	2,0	2,8	0,2	0,9	2,4	38,0
12	12,4	1,0	6,3	32,9	4,0	11,5	3,8	12,9	14,3	19,0	1,5	2,5	16,1	0,2	1,4	18,1	31,3
	12,3	0,9	6,3	28,5	3,7	11,8	3,6	12,7	14,4	19,5	1,6	2,3	16,5	0,2	1,4	17,0	27,8
13	10,8	1,1	6,0	31,2	2,0	10,9	1,8	9,9	13,4	19,6	1,2	2,4	9,3	0,2	1,3	7,9	31,5
	11,4	1,0	5,9	30,7	2,1	11,1	2,0	10,6	13,2	21,3	1,3	2,4	11,0	0,2	1,5	8,5	31,4
14	11,6	1,5	5,4	36,8	1,0	11,6	1,0	8,9	15,0	17,5	1,4	2,1	2,9	0,2	0,6	3,1	32,3
	11,5	1,5	5,4	38,9	0,8	11,6	0,7	8,8	15,0	18,3	1,4	2,0	2,4	0,2	0,5	1,9	35,5
15	12,3	0,9	6,3	32,6	4,0	11,7	3,8	13,1	14,3	18,0	1,5	2,4	15,8	0,2	1,4	18,1	22,5
	12,2	0,9	6,3	27,6	3,6	12,0	3,6	12,6	14,3	18,1	1,6	2,5	16,4	0,2	1,4	17,4	20,3
16	10,9	0,9	6,3	30,2	1,6	11,7	1,4	8,2	13,7	22,1	1,3	2,4	5,6	0,2	1,0	6,6	42,2
	11,7	1,5	5,9	29,3	1,5	11,4	1,7	8,6	13,7	21,2	1,3	2,5	6,3	0,2	0,9	7,7	34,7
17	11,5	1,5	5,6	39,9	1,2	12,0	0,1	8,6	15,6	19,1	1,4	2,1	0,7	0,2	0,6	0,1	38,3
	11,8	1,5	5,7	38,4	0,3	12,3	0,0	9,1	15,6	20,2	1,4	2,0	0,2	0,2	0,5	0,0	39,5
18	12,3	1,1	6,3	32,2	4,0	11,0	3,8	12,9	14,2	18,8	1,6	2,4	16,4	0,2	1,4	18,8	26,0
	12,1	0,9	6,3	27,5	3,6	10,8	3,6	12,3	14,1	20,6	1,6	2,4	16,4	0,2	1,4	17,3	26,4
19	11,0	1,0	5,7	32,9	2,2	11,4	1,9	9,8	13,7	21,3	1,3	2,4	10,0	0,2	1,4	7,6	30,0
	11,9	1,0	5,8	31,7	2,5	10,7	2,2	11,2	13,7	20,8	1,3	2,4	11,8	0,2	1,4	9,5	30,9
20	11,4	1,4	4,9	36,7	0,3	11,6	0,0	8,1	14,0	16,0	1,3	2,2	0,3	0,2	0,4	0,0	29,4
	11,6	1,4	5,1	38,4	0,1	12,1	0,0	8,5	14,7	15,2	1,3	2,2	0,2	0,2	0,4	0,0	29,8
21	12,6	1,0	6,3	31,5	4,1	11,4	3,8	12,9	14,4	18,5	1,6	2,4	16,4	0,2	1,4	18,3	28,7
	12,4	0,9	6,4	27,0	3,6	11,7	3,6	12,6	14,6	19,7	1,7	2,5	16,7	0,2	1,5	16,8	25,8
22	10,9	1,1	5,8	28,2	1,6	12,0	1,7	8,7	14,0	19,3	1,2	2,5	7,9	0,2	0,9	6,6	31,2
	11,8	1,4	5,7	28,9	1,4	11,1	1,6	9,5	13,1	18,5	1,4	2,5	7,5	0,2	0,9	6,2	28,7
23	11,7	1,4	5,7	39,5	0,6	12,3	0,0	9,1	15,3	19,5	1,4	2,1	0,2	0,2	0,6	0,0	36,3
	11,7	1,3	5,6	37,5	0,2	12,1	0,0	8,9	15,4	18,5	1,4	2,0	0,1	0,2	0,6	0,0	34,4
24	12,2	1,0	6,1	29,8	3,8	10,6	3,8	12,4	13,9	14,9	1,6	2,4	16,1	0,2	1,4	18,1	22,1
	12,2	0,9	6,1	26,4	3,4	10,8	3,6	12,3	14,1	15,5	1,6	2,4	16,5	0,2	1,5	16,9	19,9
25	11,2	1,2	5,5	26,3	2,0	11,0	1,7	9,2	13,0	20,1	1,2	2,5	9,1	0,2	1,0	7,3	30,4
	12,1	1,4	5,6	30,3	1,7	11,2	1,9	10,9	13,3	20,2	1,3	2,6	10,4	0,2	1,1	6,9	31,7
26	11,6	1,4	5,6	40,6	0,7	12,2	0,0	9,2	15,7	18,2	1,4	2,0	0,1	0,2	0,8	0,0	34,6
	11,8	1,3	5,6	38,7	0,3	12,1	0,0	9,0	15,3	17,6	1,4	2,0	0,0	0,2	0,7	0,0	34,5
27	12,6	1,0	6,5	31,0	3,9	11,9	3,9	12,8	14,4	19,7	1,7	2,5	16,8	0,2	1,5	18,7	28,5
	12,3	0,9	6,2	26,5	3,4	11,5	3,7	12,3	14,1	19,9	1,7	2,5	16,8	0,2	1,6	17,5	25,4



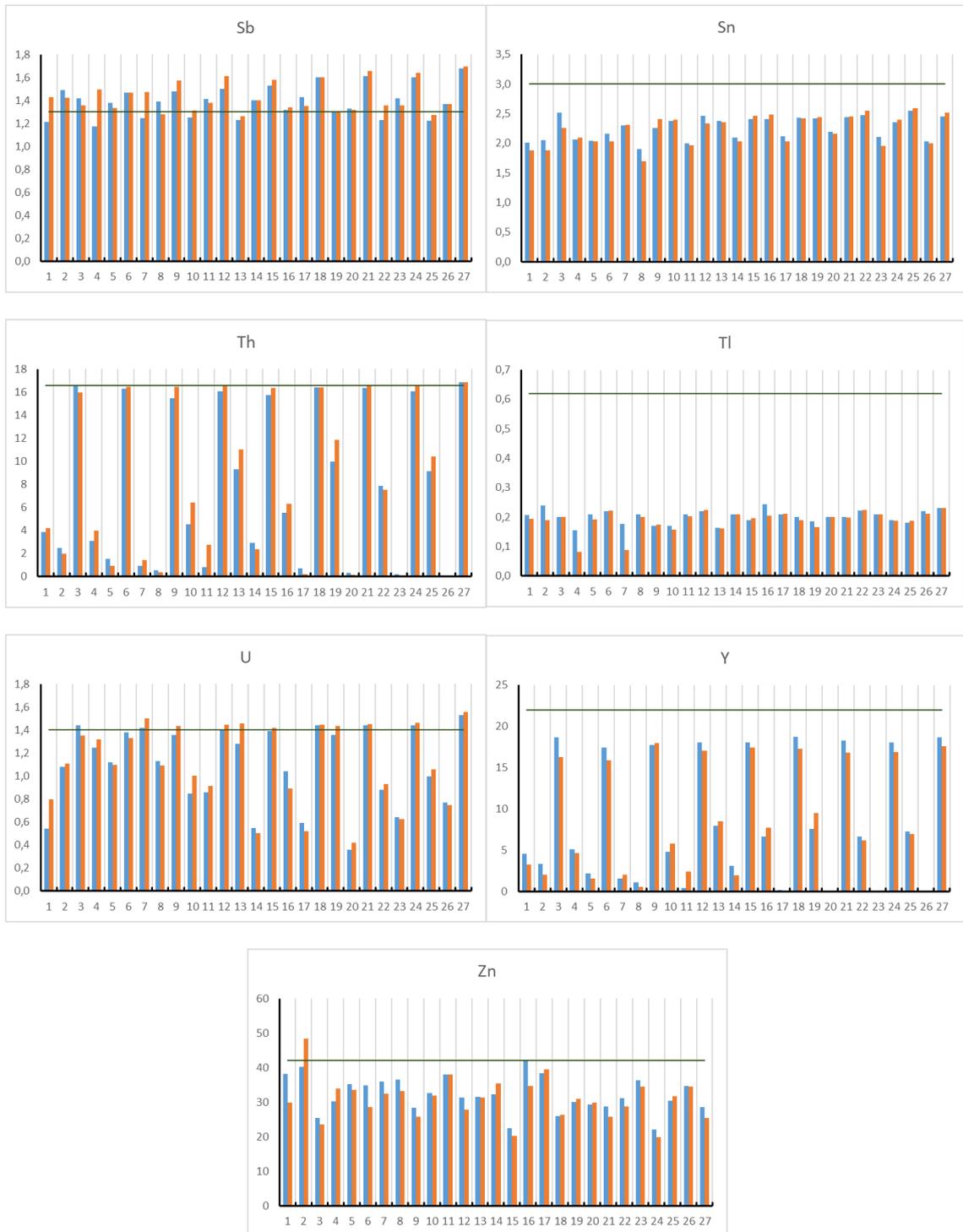


Figura 3. Concentración extraída de cada elemento en los 27 experimentos

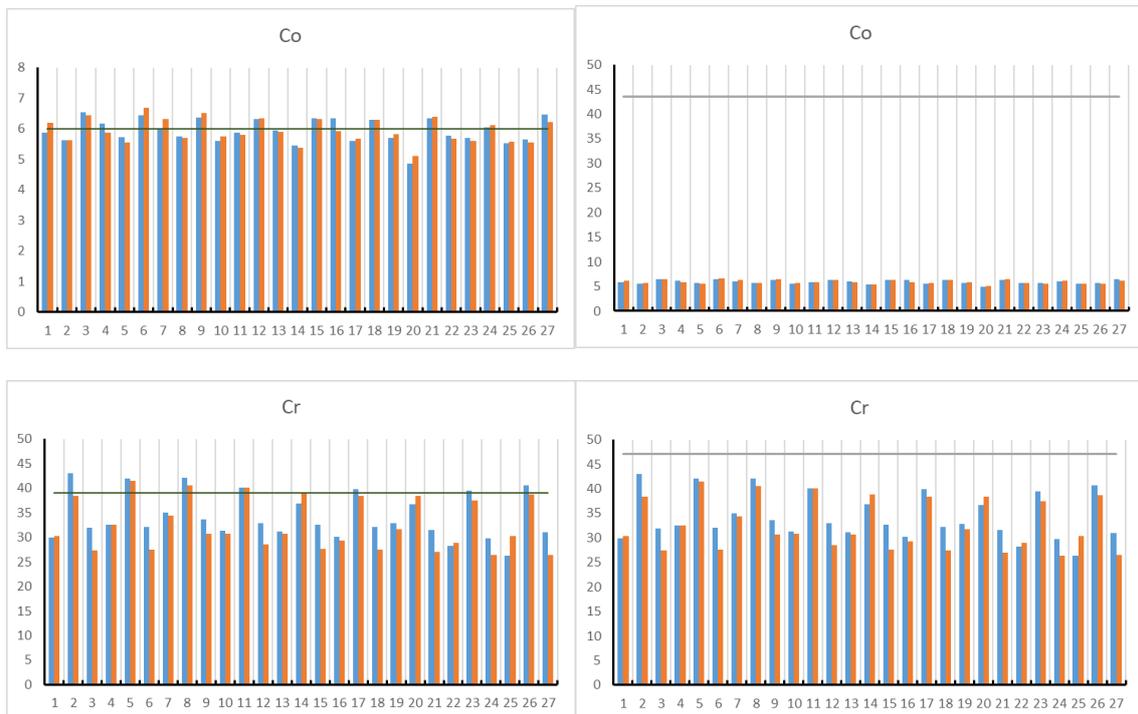
Tabla 8. Comparativa de resultados del diseño experimental, XRF y valores certificados

Elemento	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
μ_0 (mg/Kg)	13,7	1,8	43,5	47,0	4,9	16,3	4,4	12,0	19,4	20,0	1,3	3,0	16,6	0,6	1,4	22,0	42,0
\bar{x} (mg/Kg)	11,8	1,2	5,9	33,5	2,1	11,5	1,8	10,5	14,5	19,2	1,4	2,2	8,0	0,2	1,1	8,2	31,6
XRF (mg/Kg)	15	-	6	39	17	20	-	14	30	24	5	2	21	-	2	25	47

Para As, Cu, Ga, Pb, Sb, Sn, U y Zn, los valores medios obtenidos por ICP-MS, por XRF y los valores del certificado son bastante parecidos. Para Th e Y los valores de XRF y los del certificado son similares, pero los obtenidos por ICP-MS son sensiblemente inferiores, lo que indica que no se están extrayendo bien por término medio, aunque sí se extraen completamente en ciertas condiciones experimentales, como se observa en la Figura 3.

Para Cs y Ni las concentraciones medias obtenidas por ICP-MS son del orden de los valores certificados, sin embargo, los resultados de XRF son superiores.

Para Co y Cr los valores obtenidos por ICP-MS son muy inferiores a los del certificado, y muy parecidos a los de XRF, por lo que nos ha llevado a poner en duda los valores del certificado. La Figura 4 muestra los resultados medios obtenidos por ICP para estos dos elementos, comparados con el valor determinado por XRF (izquierda) y con el valor certificado (derecha). En consecuencia, se ha decidido tomar como válidos los resultados de XRF a la hora de realizar los cálculos de sesgo relativo para estos dos elementos.

**Figura 4.** Comparativa XRF/Certificado para Cr y Co

4.2 Repetibilidad del método

Con el fin de evaluar la repetibilidad de los resultados de la determinación de contenidos totales de elementos traza en suelos por ICP-MS, se analizaron alícuotas del suelo CMR de 0.25 g por sextuplicado.

La Tabla 9 recoge los resultados analíticos, en mg por kg de suelo, de los 17 elementos determinados en las disoluciones procedentes de cada una de las 6 réplicas. A los resultados mostrados se les ha restado ya el correspondiente blanco.

El experimento numerado como 28 se ha llevado a cabo con las condiciones: 6 mL de ácido nítrico (N3), 1 mL de ácido clorhídrico (C2), 2mL de ácido fluorhídrico (F2), calentamiento durante 20 minutos (t3) a 190°C (T2) y llevando a cabo la eliminación del exceso de HF añadiendo 1,4 g de ácido ortobórico sólido y posterior calentamiento en horno microondas durante 5 minutos a 180°C (E3).

El experimento número 29 se ha llevado a cabo con los mismos niveles para la digestión (N, C, F, t y T), pero en este caso el método empleado para eliminar el exceso de HF fue la evaporación (E2).

Tabla 9. Datos experimentales, en mg/kg, de las seis réplicas para ambos experimentos

Exp	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
28	12,3	0,9	6,3	32,6	4,0	11,7	3,8	13,1	14,3	18,0	1,5	2,4	15,8	0,2	1,4	18,1	22,5
	12,2	0,9	6,3	27,6	3,6	12,0	3,6	12,6	14,3	18,1	1,6	2,5	16,4	0,2	1,4	17,4	20,3
	12,1	1,0	6,0	37,0	4,7	7,5	3,5	12,6	13,4	17,3	1,5	2,5	14,8	0,1	1,3	15,9	27,9
	11,6	1,0	5,8	36,1	4,6	7,3	3,5	12,1	13,0	18,7	1,5	2,5	15,2	0,2	1,3	15,6	33,3
	12,2	0,9	5,9	35,4	4,6	7,4	3,5	12,5	13,3	19,0	1,6	2,5	15,2	0,1	1,3	15,4	28,4
	11,9	0,9	5,9	36,3	4,6	7,4	3,4	12,4	13,2	17,1	1,5	2,5	15,0	0,1	1,3	15,5	26,0
29	11,2	0,9	6,0	31,8	2,0	10,7	0,0	8,3	13,9	17,2	1,6	2,3	0,1	0,2	0,8	0,0	26,2
	11,2	0,9	5,9	29,6	0,7	10,6	0,0	8,5	13,9	17,4	1,5	2,2	0,1	0,2	0,7	0,0	23,2
	11,6	0,9	6,2	30,9	1,3	11,0	0,0	8,6	14,3	17,4	1,5	2,2	0,3	0,2	0,8	0,1	32,3
	11,6	0,9	6,2	30,5	0,6	11,0	0,0	8,4	14,3	16,6	1,5	2,1	0,0	0,2	0,8	0,0	24,1
	11,5	1,1	6,2	29,7	1,3	11,1	0,0	8,5	14,4	16,9	1,5	2,2	0,1	0,2	0,8	0,0	30,8
	11,4	1,0	6,0	29,6	0,6	10,8	0,0	8,4	14,1	17,0	1,5	2,2	0,1	0,2	0,7	0,0	23,7

Con estos datos se ha estimado la repetibilidad, como desviación estándar relativa, DER (Tabla 10) y el sesgo relativo referido al valor certificado, δ_{rel} (Tabla 11).

Tabla 10. Desviación estándar para los 17 elementos

Elemento	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn
28	2,2	6,0	3,8	10,4	10,3	26,0	3,8	2,7	4,2	4,1	2,3	1,5	3,7	15,7	3,7	6,8	17,5
29	1,6	6,2	1,8	3,0	52,9	1,9	244,7	1,2	1,6	1,6	1,8	2,8	70,3	2,2	5,3	72,2	14,6

Se observa que la repetibilidad es en general aceptable, teniendo en cuenta los bajos niveles de concentración de los elementos en las muestras, siendo mejor en las condiciones que usan el nivel E3 del factor eliminación (adición de ácido bórico y calentamiento posterior en microondas). En el caso de los elementos Cs, Dy, Th e Y los valores de DER son inaceptables. La

falta de precisión puede estar relacionada con las posibles pérdidas durante la etapa de evaporación (E2).

Tabla 11. sesgos relativos para los 17 elementos

Elemento	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	Y	Zn	
28	δ rel	-12,0	-47,9	0,7	-12,4	-11,2	-45,6	-19,6	4,6	-30,0	-9,7	18,7	-17,6	-7,2	-74,0	-4,2	-25,8	-37,1
29		-16,6	-47,2	1,3	-22,2	-77,9	-33,3	-99,9	-29,4	-27,0	-14,6	16,5	-27,4	-99,3	-65,1	-44,2	-99,8	-36,3

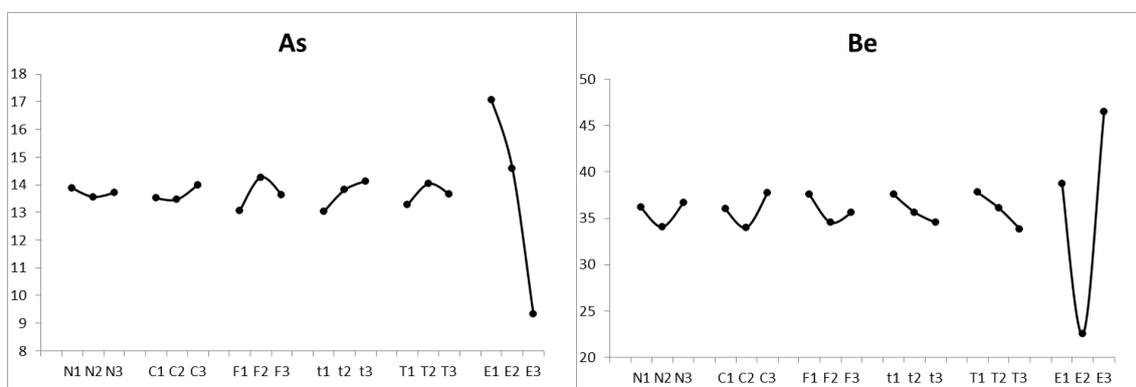
En cuanto a los sesgos relativos, han sido en general negativos y elevados, indicando nuevamente la dificultad para conseguir la extracción cuantitativa de algunos elementos. Además, aquí podemos observar un claro aumento del sesgo al eliminar el exceso de HF por evaporación, con pérdidas muy notables de elementos como Cs, Dy, Th, Y y, en menor medida, Ga.

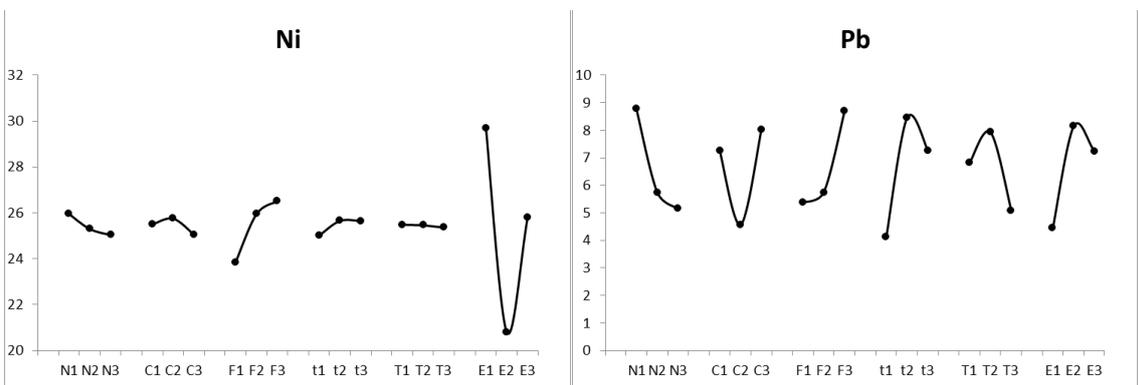
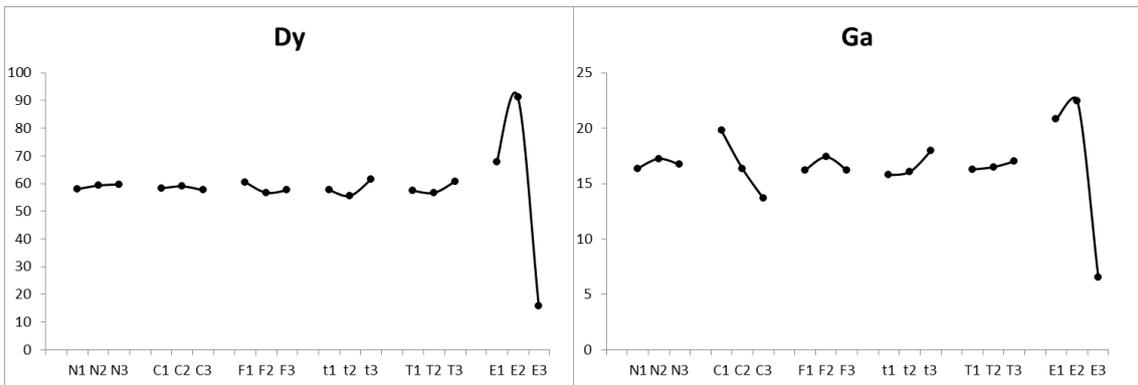
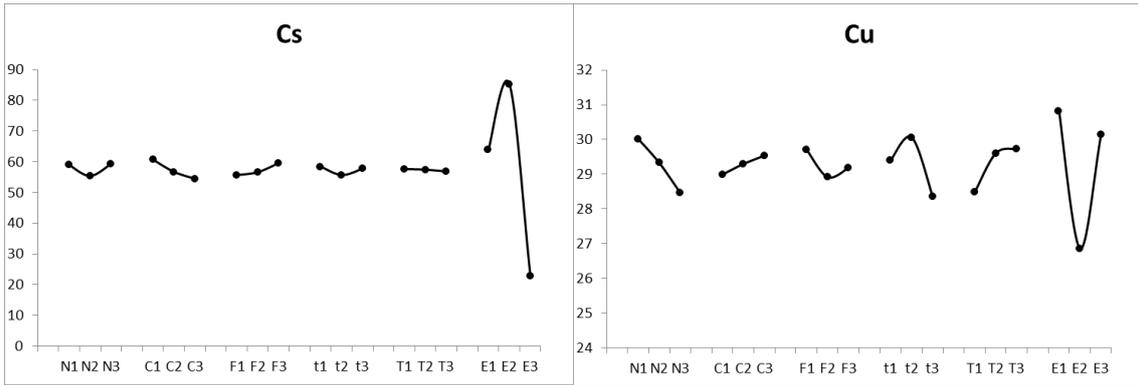
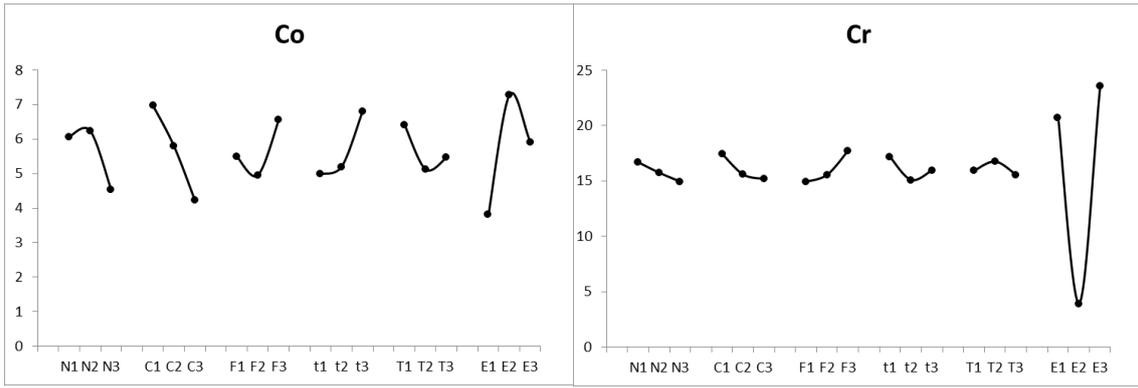
4.3 Gráficas de medias

La Figura 5 muestra los sesgos relativos medios, en valor absoluto, obtenidos a cada nivel de cada factor para los 17 elementos analizados. Es necesario resaltar que, como ha podido extraerse de la Figura 4, la gran mayoría de sesgos fueron negativos, dado que la recuperación no fue en general cuantitativa. Solo se obtuvieron sesgos positivos puntualmente (Pb, Sb, Ga...).

De la observación de la Figura 5 se extrae que, en general, el factor método de eliminación del exceso de HF (E) influye mucho más en la concentración de elemento recuperada que el resto de factores ensayados. El método de eliminación no afecta por igual a la recuperación de todos elementos. Así, por ejemplo, mientras Be, Cr, Ni o Zn se recuperan mejor en el método B (evaporación), para elementos como As, Cs, Dy, Ga o Th, el tratamiento con ácido ortobórico seguido del calentamiento en horno microondas (método C) genera las mejores recuperaciones y menores sesgos. El método A (adición en frío de ácido ortobórico) resultó ser el tratamiento óptimo únicamente en el caso de Co y Sb.

En comparación con el factor E, el resto de factores experimentales parecen tener un efecto casi irrelevante.





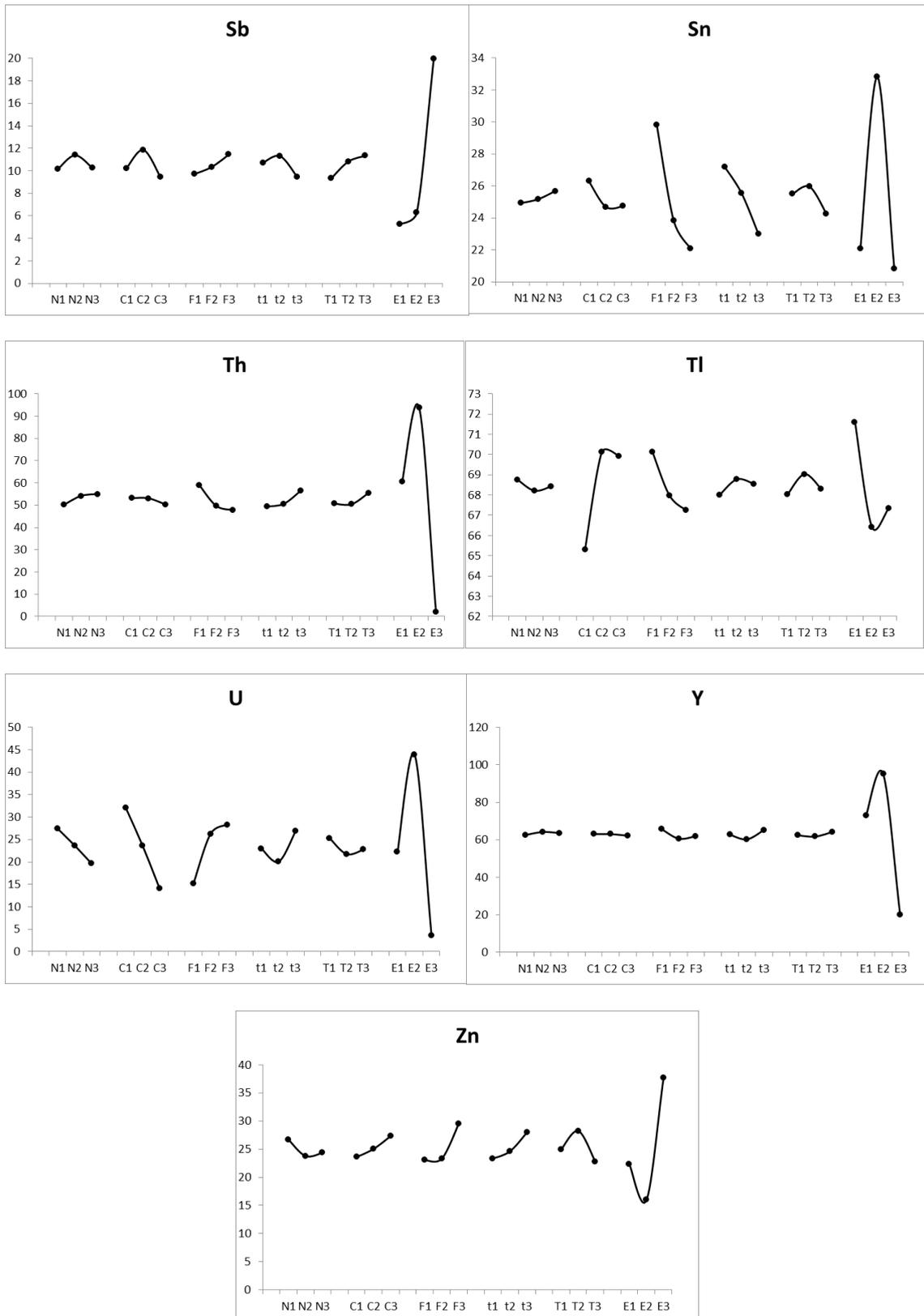


Figura 5. Graficas de medias

En el caso del Tl, cuya recuperación ha sido pobre en general, ésta ha mejorado ligeramente en los experimentos en ausencia de ácido clorhídrico, lo que podría deberse a la formación de TlCl insoluble (Wiberg *et al*, 2001).

Se ha documentado la pérdida de diversos elementos por volatilización en disoluciones de HF o HCl (Link y Kingston, 2000). En presencia de ácido clorhídrico, se han observado pérdidas significativas de elementos como Al, Au, Ba, C, Cd, Ga, Hf, Hg, In, P, Pa, Ra, S y, especialmente, Th y Tl. En disoluciones de ácido fluorhídrico han sido descritas pérdidas de Nb y Os. Elementos como As, B, Cr, Ge, Mo, Pb, Re, Ru, Sb, Se, Si, Sn, Ta, Te, Ti, V, W, Zn y Zr pueden ver su concentración disminuida en ambos medios.

4.4 ANOVA

El análisis de varianza es una herramienta estadística que sirve para analizar datos experimentales que pueden depender de muchos efectos que actúan a la vez sobre la respuesta de un método, nos permite estimar la varianza debida a cada factor y su contribución a la variación total de los resultados.

La variabilidad de los resultados se debe, por una parte, a las variaciones que provocan los distintos factores que influyen en la respuesta (F, C, N, t, T, E) y sus interacciones y, por otra, al error experimental aleatorio. El ANOVA intenta explicar esa variabilidad asignando un porcentaje de contribución sobre la variación total a cada uno de los factores y al error experimental o residual.

En la Tabla 3 se han definido los 6 factores que se han ensayado en este trabajo.

La fuente de variación no controlada del ANOVA, el residual, incluye los errores aleatorios del procedimiento experimental, el efecto de los factores que puedan influir en la respuesta y no se hayan tenido en cuenta y las interacciones entre factores que no se han considerado.

Los cálculos de ANOVA de los 17 elementos se han realizado con una hoja de cálculo Excel y se describen a continuación. A partir de la matriz de nuestro diseño y una vez realizada la experimentación, se puede calcular la suma de cuadrados totales.

$$SS_T = \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^N x_i^2 - TG$$

donde x_i es cada uno de los valores obtenidos durante la experimentación, N es el número total de experimentos realizados (27 experimentos \times 2 réplicas = 54 experimentos), \bar{x} es la gran media (media de todos los datos) y TG es el término general calculado como

$$TG = \frac{(\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N}$$

Esta expresión para nuestro diseño $L_{27}(3^{13})$ también se puede escribir como

$$SS_T = \sum_{K=1}^{k=13} SS_K + SS_R$$

siendo SS_K la suma de cuadrados para cada factor y SS_R la suma de cuadrados para el residual

La suma de cuadrados de cada factor se puede calcular a su vez como

$$SS_K = \sum_{f=1}^3 \frac{T_{K,f}^2}{n_{K,f}} - TG$$

Donde $n_{K,f}$ es el número de datos para cada nivel f del factor K (9 veces cada nivel \times 2 réplicas = 18) y

$$T_{K,f} = \sum_{i=1}^{n_{K,f}} x_{i,f}$$

y $x_{i,f}$ es el valor de la respuesta para cada nivel f del factor.

Combinando estas expresiones obtenemos la expresión usada para el cálculo de las sumas de cuadrados de cada factor (o interacción).

$$SS_K = \sum_{f=1}^3 \frac{(\sum_{i=1}^{n_{K,f}} x_{i,K,f})^2}{n_{K,f}} - \frac{(\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N}$$

Teniendo en cuenta que

$$SS_T = \sum_{K=1}^{k=13} SS_K + SS_R$$

podemos calcular SS_R por diferencia.

A partir de las sumas de cuadrados podemos calcular los cuadrados medios o varianza (MS o σ^2) para cada término, como cociente entre SS y g.d.l.

$$MS_K = \frac{SS_K}{g.d.l_K}$$

Para cada factor el número de grados de libertad (g.d.l) se corresponde con el número de niveles del factor menos 1 (3 niveles por factor $- 1 = 2$). Para las interacciones entre factores ($K \times K$) el número de grados de libertad se corresponde con el producto de los grados de libertad de los factores que interactúan (2 g.d.l por factor \times 2 g.d.l por factor = 4 g.d.l por interacción).

Los grados de libertad del residual se calculan mediante diferencias, de igual manera que con las sumas de cuadrados, porque ambos cumplen la propiedad aditiva.

$$g.d.l_{res} = g.d.l_T + \sum_K g.d.l_K$$

Donde $g.d.l_T$ es el número total de datos menos 1 ($54 - 1 = 53$), y $g.d.l_K$ son los grados de libertad que aportan los factores y las interacciones (2 g.d.l por factor \times 6 factores + 4 g.d.l por interacción \times 3 interacciones = 24). Entonces $g.d.l_{res} = 53 - 24 = 29$. Con esto podemos calcular

MS_{res} La suma de cuadrados (SS) y grados de libertad (g.d.l.) de la columna 13, que no alberga ningún factor, están incluidas en el residual.

El valor del estadístico F de Fisher se calcula como cociente entre el cuadrado medio del factor y el del residual, y se usa como criterio para evaluar si el factor tiene un efecto significativo en la variabilidad de la respuesta medida. El valor F calculado se compara con el valor tabulado para un nivel de confianza determinado $\alpha = 0.05$, y los grados de libertad del factor (numerador) y del residual (denominador) (Ross, 1988).

$$F = \frac{MS_K}{MS_{res}}$$

Si F calculado $>$ F crítico se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que el factor es significativo. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis nula, por lo que no hay evidencia de que el factor afecte a la respuesta a optimizar.

Una forma más fácil de verlo es calcular la probabilidad p a posteriori (la probabilidad acumulada bajo la curva de la distribución F a partir del valor F calculado) y compararla con el nivel de significación empleado ($\alpha = 0.05$). Si $p < \alpha$ rechazamos la hipótesis nula y si $p > \alpha$ no podemos rechazar la hipótesis nula.

Aplicando todo esto se obtiene la tabla de ANOVA. La Tabla 12 muestra a modo de ejemplo los resultados del ANOVA para el As. Las tablas de ANOVA de los 16 elementos restantes se recogen en la sección Anexos.

Tabla 12. Tabla ANOVA para el As

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	13,02897645	2	6,514	1,206	3,328	0,313955645	1,7
T	5,176494701	2	2,588	0,479	3,328	0,624114886	0,7
FxT	8,634972445	4	2,159	0,400	2,701	0,807240301	1,1
E	561,4733052	2	280,737	51,973	3,328	2,57895E-10	71,8
FxE	15,9558707	4	3,989	0,738	2,701	0,573406483	2,0
TxE	4,770944029	4	1,193	0,221	2,701	0,92463269	0,6
C	3,073515116	2	1,537	0,285	3,328	0,754463657	0,4
t	11,75143696	2	5,876	1,088	3,328	0,350317854	1,5
N	1,313358109	2	0,657	0,122	3,328	0,885975825	0,2
Residual	156,6448248	29	5,402				20,0
Total	781,8236985	53					100,0

La Tabla 13 condensa los valores p a posteriori de cada factor e interacción para todos los elementos. En rojo se han señalado los factores que han resultado significativos.

Tabla 13. Probabilidad p a posteriori para los factores e interacciones

Factor	p																
	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	y	Zn
F	0,314	0,577	0,044	0,245	0,165	0,663	0,009	0,583	0,008	0,026	0,242	0,000	0,000	0,041	0,000	0,000	0,015
T	0,624	0,406	0,114	0,769	0,933	0,324	0,005	0,853	0,987	0,097	0,136	0,091	0,001	0,647	0,194	0,110	0,083
FxT	0,807	0,960	0,003	0,220	0,170	0,343	0,001	0,223	0,652	0,020	0,807	0,650	0,000	0,018	0,000	0,006	0,123
E	0,000	0,019	0,000														
FxE	0,573	0,356	0,000	0,125	0,038	0,201	0,000	0,002	0,745	0,104	0,000	0,001	0,000	0,126	0,000	0,000	0,615
TxE	0,925	0,565	0,199	0,988	0,673	0,459	0,009	0,706	0,619	0,028	0,020	0,000	0,092	0,895	0,023	0,022	0,820
C	0,754	0,441	0,001	0,377	0,019	0,829	0,503	0,000	0,692	0,027	0,063	0,076	0,070	0,000	0,000	0,709	0,300
t	0,350	0,576	0,012	0,485	0,394	0,171	0,000	0,230	0,666	0,006	0,192	0,000	0,000	0,785	0,007	0,001	0,146
N	0,886	0,488	0,035	0,821	0,232	0,237	0,335	0,701	0,507	0,022	0,319	0,663	0,022	0,879	0,001	0,082	0,467

Podemos ver que el factor E (método de eliminación del exceso de HF) resultó significativo para todos los elementos, seguido en importancia por el factor F (cantidad de HF), que es significativo en 10 de los 17 elementos. También se puede observar que los factores temperatura y cantidad de ácido nítrico fueron significativos para un número muy limitado de elementos.

Respecto a las interacciones entre los factores F, T y E, 10 de los elementos seleccionados se ven afectados por alguna de ellas, siendo Dy, U e Y los elementos para los que son significativas todas ellas.

Para los elementos As, Be, Cr y Cu solo el factor E, eliminación del exceso de HF, fue significativo, mientras que, para Co, Dy, Pb, Th, U e Y, fueron significativos casi todos los factores investigados.

El último paso del ANOVA es calcular el porcentaje de contribución a la varianza total para cada factor e interacción. Como las varianzas no tienen la propiedad aditiva, pero sí tienen las sumas de cuadrados, el porcentaje de contribución se calcula como

$$\% \text{contribución} = \frac{SS_K}{SS_T} \cdot 100$$

La Tabla 14 muestra los porcentajes de contribución obtenidos correspondientes a factores e interacciones para los 17 elementos.

Tabla 14. Porcentaje de contribución de los factores e interacciones a la variabilidad total

Factor	% Contribucion																
	As	Be	Co	Cr	Cs	Cu	Dy	Ga	Ni	Pb	Sb	Sn	Th	Tl	U	y	Zn
F	1,7	1,0	4,1	1,4	0,4	1,1	0,3	0,4	6,9	7,1	0,7	20,7	1,5	6,6	6,8	0,4	6,3
T	0,7	1,6	2,8	0,3	0,0	3,1	0,3	0,1	0,0	4,4	1,0	1,0	0,3	0,8	0,5	0,1	3,6
FxT	1,1	0,5	11,9	3,0	0,7	6,1	0,6	2,4	1,5	11,9	0,4	0,5	0,8	12,9	4,6	0,4	5,2
E	71,8	61,7	18,8	75,2	93,1	29,4	93,5	66,3	69,9	7,9	63,7	54,6	91,2	22,4	55,6	95,8	57,8
FxE	2,0	3,9	19,3	3,9	1,2	8,3	3,7	9,0	1,2	7,3	21,1	4,9	4,5	7,2	11,6	1,8	1,8
TxE	0,6	2,6	3,8	0,2	0,2	4,9	0,4	0,8	1,6	11,0	3,3	6,2	0,2	1,0	1,8	0,3	1,0
C	0,4	1,5	11,7	1,0	0,9	0,5	0,0	8,1	0,4	7,1	1,5	1,0	0,1	21,8	11,1	0,0	1,6
t	1,5	1,0	6,2	0,7	0,2	4,9	0,6	1,2	0,5	10,7	0,8	5,7	0,6	0,4	1,6	0,4	2,7
N	0,2	1,3	4,5	0,2	0,3	3,9	0,1	0,3	0,8	7,5	0,6	0,2	0,2	0,2	2,6	0,1	1,0
Res	20,0	25,0	17,1	14,2	2,9	37,8	0,7	11,3	17,2	25,1	7,0	5,4	0,6	26,6	3,9	0,6	19,0

Se observa que, de forma general, el factor E (eliminación del exceso de HF) tiene un porcentaje de contribución muy superior al resto de los factores. Como excepciones tenemos al Pb y al Tl.

Para el Pb la contribución de todos los factores es similar, siendo superior para el error residual.

En el caso del Tl, los factores que contribuyen en gran medida son la eliminación de exceso de HF, el residual y, como era de esperar teniendo en cuenta todo lo discutido anteriormente, la cantidad de ácido clorhídrico.

Para el factor cantidad de ácido fluorhídrico (F) destaca su elevada contribución sobre el Sn.

El Cu tiene un valor de contribución del residual bastante superior que para el resto de los elementos. Una posible explicación es se esté produciendo contaminación de la muestra por los conos del ICP-MS, que contienen dicho metal.

4.5 Elección de los niveles óptimos de los factores significativos

Para elegir los niveles óptimos de cada factor significativo para cada elemento, se ha aplicado el test del recorrido múltiple de Duncan.

Esta prueba se emplea para efectuar comparaciones múltiples entre las tres medias obtenidas para cada factor y exige que se cumplan dos condiciones previas: el número de experimentos a cada nivel ha de ser el mismo y el factor sea significativo.

En primer lugar, se calcula el valor absoluto de las diferencias entre cada par de medias para cada nivel.

Se calcula

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$$

Siendo σ^2 la varianza del residual calculada en el ANOVA y n el número de datos de cada nivel del factor (en la matriz de diseño cada nivel aparece 9 veces \times 2 réplicas = 18 datos, este valor es el mismo para todos los factores, pues todos tienen 3 niveles).

Se calcula el valor

$$R_p = r_p \cdot \sigma_x$$

donde p es un subíndice que indica el número de medias que hay entre las dos a comparar, estas mismas incluidas, en nuestro caso como tenemos 3 medias, si comparamos la mayor con la menor $p=3$, y si comparamos la mayor con la intermedia o la menor con la intermedia $p=2$. El valor r_p es un estadístico tabulado (*Tallarida y Murray, 1987*) para el nivel de significación empleado, el valor p y los grados de libertad del residual (29 en este trabajo). Se obtienen dos valores $r_2 = 2,892$ y $r_3 = 3,039$ que, utilizando la expresión anterior, nos dan para cada elemento los valores R_2 y R_3 .

Finalmente, se comparan las diferencias entre las medias a los distintos niveles del factor significativo con su valor correspondiente R_p . Si la diferencia es mayor que R_p quiere decir que

hay diferencias significativas entre los dos niveles del factor que se están comparando y se elegirá el nivel que nos de la respuesta óptima, que en nuestro caso es un sesgo relativo mínimo.

Si se da el caso contrario, y la diferencia es menor que R_p , quiere decir que no hay diferencias significativas entre los niveles del factor que se están comparando, por lo que ambos serían igualmente válidos para obtener la respuesta óptima; en este caso se elegirá el más conveniente teniendo en cuenta aspectos económicos o de comodidad.

La Tabla 15 muestra un resumen de los niveles óptimos de los factores significativos hallados para cada uno de los elementos analizados. En el caso en el que aparecen dos niveles juntos, significa que se pueden utilizar indistintamente.

Tabla 15. Nivel óptimo para cada factor

Elem	Factores											
	F		C		N		T		t		E	
	signific	óptimo										
As	NO	-	SI	E3								
Be	NO	-	SI	E2								
Co	SI	F1-F2	SI	C3	SI	N3	NO	-	SI	t1-t2	SI	E1
Cr	NO	-	SI	E2								
Cs	NO	-	SI	C2-C3	NO	-	NO	-	NO	-	SI	E3
Cu	NO	-	SI	E2								
Dy	SI	F2-F3	NO	-	NO	-	SI	T1-T2	SI	t2	SI	E3
Ga	NO	-	SI	C2-C3	NO	-	NO	-	NO	-	SI	E3
Ni	SI	F1	NO	-	NO	-	NO	-	NO	-	SI	E2
Pb	SI	F1-F2	SI	C2	SI	N2-N3	NO	-	SI	t1	SI	E1
Sb	NO	-	SI	E1-E2								
Sn	SI	F3	NO	-	NO	-	NO	-	SI	t3	SI	E1-E3
Th	SI	F2-F3	NO	-	SI	N1-N3	SI	T1-T2	SI	t1-t2	SI	E3
Tl	SI	F2-F3	SI	C1	NO	-	NO	-	NO	-	SI	E2-E3
U	SI	F1	SI	C3	SI	N3	NO	-	SI	t1-t2	SI	E3
Y	SI	F2-F3	NO	-	NO	-	NO	-	SI	t2	SI	E3
Zn	SI	F1-F2	NO	-	NO	-	NO	-	NO	-	SI	E2

En la tabla vemos que los factores significativos son $E > F > C$, y que los factores N, T y t en general no han sido significativos.

Para N, T, y t en las pocas ocasiones en las que han sido significativos su porcentaje de contribución no ha sido superior al 7,5%, 0,3% y 10,7%, respectivamente.

4.5 Propuesta de método

Con el fin de establecer un método de disolución de muestras de suelo único, capaz de maximizar la recuperación de la mayor parte de elementos traza de interés potencial, se ha elegido el nivel de cada factor significativo que en más ocasiones ha resultado ser el óptimo.

Para la mayor parte de los elementos las condiciones óptimas de la etapa de digestión han resultado ser N3, F2, C3, t2 y T1, esto es, 6 mL de ácido nítrico, 2 mL de ácido fluorhídrico y 2 mL de ácido clorhídrico para 0,25 g de muestra de suelo. La digestión en el horno microondas se realiza calentando a 180 °C durante 15 min, precedido por una rampa de calentamiento de 5 min.

En cuanto a la etapa de eliminación del exceso de ácido fluorhídrico, para Be, Cr, Cu, Ni, Sb, Tl y Zn el nivel óptimo es E2 (eliminación por evaporación en presencia de ácido nítrico); por el contrario, para As, Cs, Dy, Ga, Sn, Th, Tl, U e Y el óptimo para la eliminación del exceso de HF ha sido E3 (adición de 1,4 g de ácido ortobórico sólido y posterior calentamiento en horno microondas durante 5 min a 180°C).

Debido a su mayor simplicidad y rapidez, se propone seleccionar el nivel E3 cuando se precise un método único de digestión para la determinación simultánea de elementos traza en muestras de suelo y sedimentos.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha optimizado la disolución con ácidos asistida por microondas de muestras de suelos y sedimentos, debido al interés en conocer los contenidos totales de elementos traza en este tipo de materiales, con vistas a la evaluación de su potencial impacto ambiental o por razones económicas relacionadas con el uso agrícola o minero-industrial del suelo.

La optimización se ha llevado a cabo un diseño experimental de Taguchi. Los factores de control ensayados fueron: volúmenes de ácido nítrico (N), ácido fluorhídrico (F) y ácido clorhídrico concentrados (C), tiempo de digestión (t), temperatura de digestión (T) y método de eliminación del exceso de HF (E). Los seis factores se ensayaron a tres niveles para detectar efectos cuadráticos y se asignaron a seis columnas del arreglo ortogonal $L_{27}(3^{13})$ de Taguchi. Seis columnas restantes del diseño experimental se utilizaron para estudiar las interacciones de los factores $F \times T$, $F \times E$ y $T \times E$. Este diseño experimental se aplicó a la determinación, por ICP-MS, de 17 elementos traza (As, Be, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Ga, Ni, Pb, Sb, Sn, Th, Tl, U, Y, Zn) en una muestra de suelo con contenidos certificados de estos elementos, suministrada por el *Institute of Geophysical and Geochemical Exploration*, Langfang, China (material de referencia CRM GBW07402 GSS-2). Los elementos seleccionados pueden considerarse representativos de grupos de diferentes características o reactividad: elementos tóxicos, elementos formadores de cloruros, elementos difícilmente solubilizables, elementos ligeros, elementos volátiles y tierras raras.

La determinación de los contenidos de elementos traza en las disoluciones del material de referencia certificado se llevaron a cabo utilizando ICP-MS, empleando el método de calibración por patrón interno para cuantificar los contenidos elementales con mayor exactitud.

La respuesta a optimizar fue maximizar la recuperación de los elementos o, lo que es equivalente, minimizar el sesgo relativo, respecto al valor certificado, para cada elemento.

El Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados evidenció que los factores con efecto significativo en la extracción de la mayoría de elementos seleccionados fueron $E > F > C$. Los factores t, N y T en general no fueron significativos. Sin embargo, las condiciones óptimas de MWD no fueron idénticas para los 17 elementos.

Los niveles óptimos de los factores de la etapa de digestión que produjeron la recuperación máxima de la mayoría de los elementos fueron: N3 (6 mL), F2 (2 mL), C3 (2 mL), t2 (15 min), T1 (180 °C).

En cuanto a la etapa de eliminación del exceso de ácido fluorhídrico, para Be, Cr, Cu, Ni, Sb, Tl y Zn el nivel óptimo es E2 (eliminación por evaporación en presencia de ácido nítrico); por el contrario, para As, Cs, Dy, Ga, Sn, Th, Tl, U e Y el óptimo para la eliminación del exceso de HF ha sido E3 (adición de 1,4 g de ácido ortobórico sólido y posterior calentamiento en horno microondas durante 5 min a 180°C).

Debido a la mayor simplicidad y rapidez metodológica, se propone el nivel E3 del factor eliminación de HF, esto es, adición de ácido bórico sólido tras la digestión y calentamiento en el horno microondas para facilitar la eliminación del ácido en exceso.

6. REFERENCIAS

- Abollino O., Aceto M., Malandrino M., Mentasti E., Sarzanini C., Petrella F. 2002. Heavy metals in agricultural soils from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment. *Chemosphere*. 49, 545-557.
- Aguiar de Medeiros C., Trebat N.M. 2017. Transforming natural resources into industrial advantage: The case of China's rare earth industry. *Brazilian Journal of Political Economy* 37(3), 504-526.
- Alsaleh K.A.M., Meuser H., Usman A.R.A., Al-Wabel M.I., Al-Farraj A.S. 2018. A comparison of two digestion methods for assessing heavy metals level in urban soils influenced by mining and industrial activities. *J. Environ. Manage.* 206, 731-739.
- Ardini F., Soggia F., Rugi F., Udisti R., Grotti M. 2010. Conversion of rare earth elements to molecular oxide ions in a dynamic reaction cell and consequences on their determination by inductively coupled mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25, 1588-1597.
- Barrado E., Vega M., Pardo R., Grande P., del Valle J.L. 1996. Optimisation of a purification method for metal-containing wastewater by use of a Taguchi experimental design. *Water. Res.* 30(10), 2309-2314.
- Benito, D., Ruiz, R. 1973. Prospección nutricional de cítricos en las provincias de Santiago, O'Higgins y Colchagua. *Agricultura técnica* 35(2), 70-77.
- Betinelli M., Beone G.M., Spezia S., Baffi C. 2000. Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. *Anal. Chim. Acta.* 424, 289-296.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. 1978. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building.* Wiley. USA.
- Cave M.R., Harmon K. 1997. Determination of trace metal distributions in the iron oxide phases of red bed sandstones by chemometric analysis of whole rock and selective leachate data. *The Analyst.* 122, 501-512.
- Chen M., Ma L.Q. 1998. Comparison of four USEPA digestion methods for trace metal analysis using certified and Florida soils. *J. Environ. Qual.* 27, 1294-1300.
- da Silva Y.J.A.B., do Nascimento C.W.A., Biondi, C.M. 2013. Comparison of USEPA digestion methods to heavy metals in soil samples. *Environ. Monit. Assess.* 186, 47-53.
- de Carvalho R.M.Jr., dos Santos J.A., Silva J.A.S., do Prado T.G., da Fonseca A.F., Chaves E.S., Frescura V.L.A. 2015. Determination of metals in Brazilian soils by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Monit. Assess.* 183, 535.
- de Gryz A.M. 1961. Prospección geoquímica preliminar de suelos y sedimentos en áreas seleccionadas de Chile central. *Anales Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Universidad de Chile*, 247-273.

- Dean, A., Voss, D., Draguljić, D. 2017. Design and analysis of experiments. 2^o Ed. Springer. Berlin.
- Fedyunina N.N., Seregina I.F., Bolshov M.A., Okina O.I., Lyapunov S.M. 2012. Investigation of the efficiency of the sample pretreatment stage for the determination of the rare earth elements in rock samples by inductively coupled plasma mass spectrometry technique. *Anal. Chim. Acta.* 713, 97-102.
- Frémion F., Mourier B., Courtin-Nomade A., Lenain J.F., Annouri A., Fondanèche P., Hak T., Bordas F. 2017. Key parameters influencing metallic element mobility associated with sediments in daily-managed reservoir. *Scie. Total. Environ.* 605/606, 666-676.
- Gallo A., Zannoni D., Valotto G., Nadimi-Goki M., Bini C. 2018. Concentrations of potentially toxic elements and soil environmental quality evaluation of a typical Prosecco vineyard of the Veneto region (NE Italy). *J. Soils. Sediments.* 18, 3280-3289.
- Geana E.I., Iordache A.M., Voica C., Culea M., Ionete R.E. 2011. Comparison of three digestion methods for heavy metals Determination in soils and sediments materials by ICP-MS technique. *Asian. J. Chem.* 23, 5213-5216.
- Giuliano V., Pagnanelli F., Bornoroni L., Toro L., Abbruzzese C. 2007. Toxic elements at a disused mine district: Particule size distribution and total concentration in stream sediments and mine tailings. *J. Hazard. Mater.* 148, 409-418.
- Gutierrez Pulido H., de la Vara Salazar R. 2012. Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill, 3^a Ed.
- Güven D.E., Akinci G. 2011. Comparison of acid digestion techniques to determine heavy metals in sediment and soils samples. *Gazi University Journal of Science.* 24(I), 29-34.
- Hseu Z.Y., Chen Z.S., Tsai C.C., Tsui C.C., Cheng S.F., Liu C.L., Lin H.T. 2002. Digestion methods for total heavy metals in sediments and soils. *Water. Air. Soil. Poll.* 141, 189-205.
- ISO 11466:1994. Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia.
- Kazi T.G., Jamali M.K., Arain M.B. Afridi H.I., Jalbani N., Sarfraz R.A., Ansari R. 2009. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *J. Hazard. Mater.* 161, 1391-1398.
- Krishna A.K., Mohan K.R., Murthy N.N. 2009. Determination of heavy metals in soil, sediment, and rock by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: Microwave-Assisted acid digestion versus open acid digestion technique. *Atom. Spectros.* 30(3), 75-81.
- Link D.D., Kingston H.M. 2000. Use of microwave-assisted evaporation for the complete recovery of volatile species of inorganic trace analytes. *Anal. Chem.* 72, 2908-2913.
- Moor C., Lymberopoulou T., Dietrich V.J. 2001. Determination of heavy metals in soils, sediments and geological materials by ICP-AES and ICP-MS. *Mikrochim. Acta.* 136, 123-128.
- Müller E.I., Mesko M.F., Moraes D.P., Korn M.G., Flores E.M.M., 2014. Wet Digestion Using Microwave Heating. In: *Microwave-assisted sample preparation for trace element determination.* Ch4, 99-142. Moraes Flores. Elsevier. Amsterdam.

- Okorie A., Entwistle J., Dean J.R. 2010. The optimization of microwave procedures and application to an evaluation of potentially toxic element contamination on a former industrial site. *Talanta* 82, 1421-1425.
- Roje V. 2011. Fast method of multi-elemental analysis of stream sediments samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) with prior single-step microwave-assisted digestion. *Journal of The Brazilian Chemical Society*. 22(3), 532-539.
- Rospabe M., Benoit M., Candaudap F. 2018. Determination of trace element mass fractions in ultramafic rocks by HR-ICP-MS: A combine approach using a direct digestion/dilution method and preconcentration by coprecipitation. *Geostand. Geoanal. Res.* 42(1), 115-129.
- Ross P.J. 1988. *Taguchi techniques for quality engineering*. McGraw Hill. New York.
- Sandroni V., Smith C.M.M., Donovan A. 2003. Microwave digestion of sediment, soils and urban particulate matter for trace metal analysis. *Talanta* 60, 715-723.
- Soodan R.J., Pakade Y.B., Nagpal A., Katnoria J.K. 2014. Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: A tabulated review. *Talanta* 125, 405-410.
- Tallarida R.J., Murray R.B. (1987) Duncan Multiple Range Test. In: *Manual of Pharmacologic Calculations*. Springer. New York.
- USEPA. 1996. Method 3050B, Acid digestion of sediments, sludges and soils.
- USEPA. 1994. Method 3051, Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils.
- USEPA. 2007. Method 3051A, Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils.
- USEPA. 1996. Method 3052, Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.
- Vega Alegre M. Sol. 1992. Estudio del comportamiento y especiación de metales pesados en aguas fluviales por voltamperometría de redisolución. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid.
- Vega M., Pardo, R., Barrado E., de la Fuente M.A., del Valle J.L. 1994. Application of the Taguchi experimental design of a photo-oxidation procedure for trace metal analysis in freshwater. *Fresen. J. Anal. Chem.* 350, 139-144.
- Wang T., Yue W. 2017. Carbon nanotubes heavy metal detection with stripping voltammetry: A review paper. *Electroanal.* 29(10), 2178-2189.
- Wiberg, E., Wiberg, N., Holleman, A.F. 2001. *Inorganic Chemistry*. Academic Press. San Diego.

ANEXOS

Tablas ANOVA para los 17 elementos

As

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	13,02897645	2	6,514	1,206	3,328	0,313955645	1,7
T	5,176494701	2	2,588	0,479	3,328	0,624114886	0,7
FxT	8,634972445	4	2,159	0,400	2,701	0,807240301	1,1
E	561,4733052	2	280,737	51,973	3,328	2,57895E-10	71,8
FxE	15,9558707	4	3,989	0,738	2,701	0,573406483	2,0
TxE	4,770944029	4	1,193	0,221	2,701	0,92463269	0,6
C	3,073515116	2	1,537	0,285	3,328	0,754463657	0,4
t	11,75143696	2	5,876	1,088	3,328	0,350317854	1,5
N	1,313358109	2	0,657	0,122	3,328	0,885975825	0,2
Residual	156,6448248	29	5,402				20,0
Total	781,8236985	53					100,0

Be

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	83,97889591	2	41,989	0,560	3,328	0,5774695	1,0
T	139,6367639	2	69,818	0,931	3,328	0,405802064	1,6
FxT	45,8197403	4	11,455	0,153	2,701	0,960269137	0,5
E	5371,132645	2	2685,566	35,793	3,328	1,47231E-08	61,7
FxE	342,8132454	4	85,703	1,142	2,701	0,356406785	3,9
TxE	225,5661457	4	56,392	0,752	2,701	0,56510355	2,6
C	126,4209062	2	63,210	0,842	3,328	0,440918959	1,5
t	84,371454	2	42,186	0,562	3,328	0,576016946	1,0
N	110,5204956	2	55,260	0,737	3,328	0,487528809	1,3
Residual	2175,894874	29	75,031				25,0
Total	8706,155166	53					100,0

Co

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	23,88836762	2	11,944	3,484	3,328	0,044042795	4,1
T	16,0609648	2	8,030	2,343	3,328	0,113997397	2,8
FxT	68,96974903	4	17,242	5,030	2,701	0,003333411	11,9
E	109,2464721	2	54,623	15,934	3,328	2,14303E-05	18,8
FxE	112,090238	4	28,023	8,175	2,701	0,000152944	19,3
TxE	22,01818918	4	5,505	1,606	2,701	0,199495524	3,8
C	68,06949961	2	34,035	9,928	3,328	0,000519199	11,7
t	35,75977207	2	17,880	5,216	3,328	0,01161474	6,2
N	25,90454643	2	12,952	3,778	3,328	0,034812555	4,5
Residual	99,41163274	29	3,428				17,1
Total	581,4194316	53					100,0

Cr

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	78,16451879	2	39,082	1,478	3,328	0,244693603	1,4
T	13,9988006	2	6,999	0,265	3,328	0,769221987	0,3
FxT	161,555111	4	40,389	1,528	2,701	0,220206836	3,0
E	4053,521092	2	2026,761	76,666	3,328	2,64417E-12	75,2
FxE	208,5472849	4	52,137	1,972	2,701	0,125227072	3,9
TxE	8,285276201	4	2,071	0,078	2,701	0,988330685	0,2
C	53,33451048	2	26,667	1,009	3,328	0,377119849	1,0
t	39,21102128	2	19,606	0,742	3,328	0,485163841	0,7
N	10,51910296	2	5,260	0,199	3,328	0,820699127	0,2
Residual	766,655177	29	26,436				14,2
Total	5393,791895	53					100,0

Cs

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	151,7466468	2	75,873	1,919	3,328	0,164953517	0,4
T	5,524715684	2	2,762	0,070	3,328	0,932679899	0,0
FxT	274,2147905	4	68,554	1,734	2,701	0,169573527	0,7
E	36380,78499	2	18190,392	460,041	3,328	1,08109E-22	93,1
FxE	463,3332661	4	115,833	2,929	2,701	0,037724048	1,2
TxE	93,26486827	4	23,316	0,590	2,701	0,672758303	0,2
C	358,2093318	2	179,105	4,530	3,328	0,019413318	0,9
t	76,13421247	2	38,067	0,963	3,328	0,393719055	0,2
N	121,399278	2	60,700	1,535	3,328	0,232429352	0,3
Residual	1146,682675	29	39,541				2,9
Total	39071,29478	53					100,0

Cu

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	5,937193623	2	2,969	0,417	3,328	0,663159996	1,1
T	16,71487167	2	8,357	1,173	3,328	0,323726702	3,1
FxT	33,45862193	4	8,365	1,174	2,701	0,342815544	6,1
E	160,969849	2	80,485	11,295	3,328	0,000235785	29,4
FxE	45,57204404	4	11,393	1,599	2,701	0,201242197	8,3
TxE	26,55595007	4	6,639	0,932	2,701	0,459310042	4,9
C	2,686344988	2	1,343	0,189	3,328	0,829206885	0,5
t	26,77848284	2	13,389	1,879	3,328	0,170865009	4,9
N	21,59792324	2	10,799	1,516	3,328	0,236586516	3,9
Residual	206,6415565	29	7,126				37,8
Total	546,9128379	53					100,0

Dy

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	146,0239978	2	73,012	5,626	3,328	0,008618311	0,3
T	168,7452295	2	84,373	6,501	3,328	0,0046485	0,3
FxT	337,0222259	4	84,256	6,492	2,701	0,000737901	0,6
E	53564,87245	2	26782,436	2063,661	3,328	5,41361E-32	93,5
FxE	2090,98031	4	522,745	40,279	2,701	1,91633E-11	3,7
TxE	215,2552035	4	53,814	4,147	2,701	0,008899658	0,4
C	18,25714267	2	9,129	0,703	3,328	0,503156485	0,0
t	329,5071438	2	164,754	12,695	3,328	0,0001096	0,6
N	29,48418936	2	14,742	1,136	3,328	0,335001198	0,1
Residual	376,3653572	29	12,978				0,7
Total	57276,51325	53					100,0

Ga

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	17,91408236	2	8,957	0,550	3,328	0,582797474	0,4
T	5,205294802	2	2,603	0,160	3,328	0,853025289	0,1
FxT	98,80319639	4	24,701	1,517	2,701	0,223229348	2,4
E	2770,048875	2	1385,024	85,061	3,328	7,3715E-13	66,3
FxE	375,4553819	4	93,864	5,765	2,701	0,001535323	9,0
TxE	35,32228467	4	8,831	0,542	2,701	0,705899625	0,8
C	338,6895162	2	169,345	10,400	3,328	0,000393444	8,1
t	50,29974707	2	25,150	1,545	3,328	0,230451015	1,2
N	11,73154781	2	5,866	0,360	3,328	0,700583199	0,3
Residual	472,2000785	29	16,283				11,3
Total	4175,670005	53					100,0

Ni

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	70,47185039	2	35,236	5,806	3,328	0,007570678	6,9
T	0,155833549	2	0,078	0,013	3,328	0,987247897	0,0
FxT	15,03914602	4	3,760	0,620	2,701	0,652148565	1,5
E	715,9825858	2	357,991	58,993	3,328	6,01563E-11	69,9
FxE	11,82570824	4	2,956	0,487	2,701	0,745017741	1,2
TxE	16,2303437	4	4,058	0,669	2,701	0,618972176	1,6
C	4,521554549	2	2,261	0,373	3,328	0,692224738	0,4
t	4,994701274	2	2,497	0,412	3,328	0,666441499	0,5
N	8,45110425	2	4,226	0,696	3,328	0,506556328	0,8
Residual	175,9831201	29	6,068				17,2
Total	1023,655948	53					100,0

Pb

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	120,4783231	2	60,239	4,128	3,328	0,026448892	7,1
T	73,87072117	2	36,935	2,531	3,328	0,097010338	4,4
FxT	201,2647819	4	50,316	3,448	2,701	0,020129266	11,9
E	133,4605823	2	66,730	4,573	3,328	0,018784569	7,9
FxE	123,6648956	4	30,916	2,119	2,701	0,103980145	7,3
TxE	185,4063031	4	46,352	3,176	2,701	0,027910107	11,0
C	119,5991961	2	59,800	4,098	3,328	0,027076883	7,1
t	180,5429667	2	90,271	6,186	3,328	0,005787562	10,7
N	127,4954771	2	63,748	4,368	3,328	0,021960783	7,5
Residual	423,1862595	29	14,593				25,1
Total	1688,969507	53					100,0

Sb

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	27,19310159	2	13,597	1,491	3,328	0,241851698	0,7
T	39,06383838	2	19,532	2,142	3,328	0,135606087	1,0
FxT	14,56395851	4	3,641	0,399	2,701	0,80746581	0,4
E	2419,901125	2	1209,951	132,704	3,328	2,54103E-15	63,7
FxE	801,9943472	4	200,499	21,990	2,701	1,96757E-08	21,1
TxE	125,4528203	4	31,363	3,440	2,701	0,020328052	3,3
C	55,41103684	2	27,706	3,039	3,328	0,063370681	1,5
t	31,92454527	2	15,962	1,751	3,328	0,191510674	0,8
N	21,70505569	2	10,853	1,190	3,328	0,318561825	0,6
Residual	264,41268	29	9,118				7,0
Total	3801,622509	53					100,0

Sn

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	592,15844	2	296,079	55,650	3,328	1,18144E-10	20,7
T	27,73184699	2	13,866	2,606	3,328	0,091014216	1,0
FxT	13,2442342	4	3,311	0,622	2,701	0,650254716	0,5
E	1564,883582	2	782,442	147,066	3,328	6,58834E-16	54,6
FxE	139,80852	4	34,952	6,570	2,701	0,000683914	4,9
TxE	176,466899	4	44,117	8,292	2,701	0,00013783	6,2
C	30,01209896	2	15,006	2,820	3,328	0,075982104	1,0
t	163,0268019	2	81,513	15,321	3,328	2,8791E-05	5,7
N	4,437320034	2	2,219	0,417	3,328	0,662901236	0,2
Residual	154,2903906	29	5,320				5,4
Total	2866,060134	53					100,0

Th

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	1298,164348	2	649,082	39,377	3,328	5,42586E-09	1,5
T	289,8933255	2	144,947	8,793	3,328	0,001035097	0,3
FxT	702,2065002	4	175,552	10,650	2,701	1,95897E-05	0,8
E	77927,48471	2	38963,742	2363,771	3,328	7,65681E-33	91,2
FxE	3805,804672	4	951,451	57,721	2,701	2,15255E-13	4,5
TxE	146,0706007	4	36,518	2,215	2,701	0,09198891	0,2
C	96,47333279	2	48,237	2,926	3,328	0,069558994	0,1
t	523,7781924	2	261,889	15,888	3,328	2,19134E-05	0,6
N	144,4679585	2	72,234	4,382	3,328	0,021731696	0,2
Residual	478,028007	29	16,484				0,6
Total	85412,37165	53					100,0

TI

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	80,81806534	2	40,409	3,581	3,328	0,040748769	6,6
T	9,966783718	2	4,983	0,442	3,328	0,647245778	0,8
FxT	159,4268472	4	39,857	3,532	2,701	0,018213906	12,9
E	275,9962406	2	137,998	12,229	3,328	0,00014078	22,4
FxE	88,85714522	4	22,214	1,969	2,701	0,125795623	7,2
TxE	12,18214675	4	3,046	0,270	2,701	0,894940475	1,0
C	269,0770057	2	134,539	11,923	3,328	0,000166414	21,8
t	5,511659832	2	2,756	0,244	3,328	0,784911939	0,4
N	2,912735738	2	1,456	0,129	3,328	0,879422198	0,2
Residual	327,2453628	29	11,284				26,6
Total	1231,993993	53					100,0

U

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	1785,477747	2	892,739	25,110	3,328	4,69551E-07	6,8
T	123,3683781	2	61,684	1,735	3,328	0,194216402	0,5
FxT	1207,578884	4	301,895	8,491	2,701	0,000115705	4,6
E	14651,69176	2	7325,846	206,053	3,328	7,22618E-18	55,6
FxE	3047,589582	4	761,897	21,430	2,701	2,58947E-08	11,6
TxE	472,7615769	4	118,190	3,324	2,701	0,02334513	1,8
C	2934,139086	2	1467,070	41,264	3,328	3,29387E-09	11,1
t	419,967241	2	209,984	5,906	3,328	0,007051717	1,6
N	684,6510849	2	342,326	9,629	3,328	0,00062107	2,6
Residual	1031,044996	29	35,553				3,9
Total	26358,27034	53					100,0

Y

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	251,6350965	2	125,818	10,677	3,328	0,000335215	0,4
T	56,27480472	2	28,137	2,388	3,328	0,109661353	0,1
FxT	214,168835	4	53,542	4,544	2,701	0,005684386	0,4
E	53858,89186	2	26929,446	2285,220	3,328	1,24609E-32	95,8
FxE	1039,979062	4	259,995	22,063	2,701	1,89918E-08	1,8
TxE	159,8661579	4	39,967	3,392	2,701	0,021536179	0,3
C	8,196941425	2	4,098	0,348	3,328	0,709149578	0,0
t	228,6775146	2	114,339	9,703	3,328	0,000594021	0,4
N	64,36432639	2	32,182	2,731	3,328	0,081911961	0,1
Residual	341,7411771	29	11,784				0,6
Total	56223,79577	53					100,0

Zn

Fuente var.	SS	gdl	MS	F	Fcrit	p	%Contrib.
F	488,8898919	2	244,445	4,843	3,328	0,015324645	6,3
T	274,5655157	2	137,283	2,720	3,328	0,082697933	3,6
FxT	400,8539167	4	100,213	1,985	2,701	0,123159261	5,2
E	4461,83471	2	2230,917	44,195	3,328	1,56709E-09	57,8
FxE	136,2717977	4	34,068	0,675	2,701	0,614808928	1,8
TxE	77,06009974	4	19,265	0,382	2,701	0,819891158	1,0
C	126,8869189	2	63,443	1,257	3,328	0,299595244	1,6
t	207,7925052	2	103,896	2,058	3,328	0,145927714	2,7
N	78,9532127	2	39,477	0,782	3,328	0,466879204	1,0
Residual	1463,881405	29	50,479				19,0
Total	7716,989973	53					100,0