

Dídac Sales Escoda

**POSADA A PUNT D'UN MÈTODE DE DETERMINACIÓ DE COURE EN
SÒLS DE VINYA**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per la Sra. M. Carme Masqué Tell

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2017

Índex

1. Abstract	3
2. Introducció	4
3. Objectiu	9
4. Fonaments	10
5. Part experimental	13
6. Resultats i discussió	26
7. Conclusions	39
8. Bibliografia	40

1. Abstract

Nowadays, ecologic fertilizers are of great importance and their use increases the concentration of copper in the soils of the vineyard.

A high concentration of copper in the soils can be harmful; therefore, in this project a method for the determination of copper was developed to be able to determine the concentration of copper in the soils of vineyard.

The copper was determined by atomic absorption spectroscopy after an extraction of copper from the soil. Four different extraction methods were evaluated, namely NH_4OAc and Mehlich-1 for the exchange copper, EDTA for available copper and Mehlich-3 for total copper. The Mehlich-1 method was ruled out due to low extraction power.

To validate the methods the repeatability, the recovery and the uncertainty were determined. In the samples that had low repeatability the calculations were not performed.

2. Introducció

Aquest treball s'ha realitzat al laboratori de l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) situat a Reus. L'INCAVI és un centre institucional pertanyent al Departament de Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Ambient, el qual disposa de dues estacions de viticultura i enologia, una a Vilafranca del Penedès i una altra a Reus.

Mitjançant aquestes dues estacions l'INCAVI pretén ser la infraestructura més especialitzada de la Generalitat de Catalunya posada al servei de la indústria vitivinícola, col·laborant d'aquesta manera al posicionament en els mercats, tant nacional com internacional, dels seus vins.

L'àmbit del servei d'anàlisi de l'INCAVI s'ha destinat des de la seva creació al servei del sector vitivinícola català, tanmateix també és té interès en què el sector consideri les estacions com un laboratori que col·labora en les seves activitats de recerca, desenvolupament i experimentació, fent possible la innovació continuada com presentació i valor afegit en el desenvolupament comercial dels seus productes. El servei d'anàlisi col·labora estretament amb les seccions de R+D+E de l'INCAVI fent el control analític de caràcter enològic que puguin necessitar i alhora oferint determinants serveis que han desenvolupat, complementant el servei analític enològic tradicional de les dues estacions enològiques. En qualsevol cas, tant viticultors com elaboradors podran trobar a l'INCAVI una àmplia oferta d'anàlisi¹.

Entre aquesta àmplia oferta d'anàlisis es troben els principals anàlisis que són els de terres, els de foliars, els de vins i derivats i l'expedició del seu informe certificat pertanyent. Dins de la branca de l'anàlisi de terres es troben els següents tipus: determinació de la calç activa, textura, pH, conductivitat, matèria orgànica, nitrogen total i intercanvi de cations. Aquest treball es centra en la part d'intercanvi de cations, concretament en el coure.

L'anàlisi del coure en el sòl de vinya és una anàlisi en la qual s'ha de realitzar una extracció del coure de la terra ja que aquesta és una matriu complexa. Per realitzar aquest pas s'utilitzaran diversos mètodes d'extracció per a determinar diferents tipus de coure en les terres de la DO Catalunya.

El sòl de la vinya està format per dos grups d'elements: els macroelements, que són els elements que es troben en major quantitat, que són el nitrogen, el fòsfor, el potassi, el sodi, el calci, el magnesi i el sofre, i l'altre grup que el formen els microelements, els elements que es troben en menor quantitat a la terra però que igualment són importants per al conreu de la vinya, constituït per l'alumini, el ferro, el silici, el manganès, el bor, el molibdè, el zinc i el coure.

Malgrat que estiguin classificats en dos grups hi ha mètodes d'extracció en comú, fet que facilitaria la anàlisi de variis elements en una sola extracció i la tria del procediment d'extracció es realitza mitjançant aquest concepte.

El coure s'acostuma a trobar en els sòls en forma de minerals com sulfits, sulfats, òxids, carbonats i silicats. Però el més comú seria la calcopirita CuFeS_2 , la qual està relacionada amb la pirita (FeS_2) i amb l'òxid de coure (Cu_2O). El coure també es pot arribar a introduir en els sòls mitjançant l'aplicació de pesticides que continguin coure.

Els pesticides que contenen coure són empleats àmpliament per a potenciar la parada vegetativa i per al control de les plagues com el míldiu i la botrytis, malalties comunes en la vinya² que poden provocar efectes nocius com els observats en la Figura 1.



Figura 1. Esquerra fulles afectades per el míldiu. Dreta raïm afectat per la botrytis

El míldiu és una malaltia produïda per fongs que afecta a les fulles, als raïms i als ceps. Les fulles afectades s'esgrogueeixen fins que cauen; en els raïms, als grans, es veu el miceli dels fongs, que hi forma un borrisol d'un color grisós. El remei per al míldiu és el brou bordelès, el qual consta d'una mescla de sulfat de coure i calç apagada.

La botrytis també esta produïda per fongs i dona lloc a dos tipus diferents d'infeccions en els raïms: la podridura grisa, la qual típicament ocasiona la pèrdua dels raïms afectats, i la podridura noble, la qual en vins dolços fa augmentar el percentatge de sòlids com els sucres, àcids de fruits i minerals a l'hora d'expulsar l'aigua dels raïms; com a resultat el producte final és més concentrat i queda més fi al paladar. La botrytis també complica la fermentació al produir un antifúngic que mata al llevat i freqüentment atura la fermentació abans de que el vi hagi acumulat nivells suficient d'alcohol. El remei es l'aplicació de pesticides que continguin sulfats de coure, oxiclorur de coure, etc.

Degut al control d'aquestes dues malalties fúngiques el contingut de coure que s'ha anat dipositant en el sòl ha augmentat bastant en els últims anys, i amb la incorporació de la viticultura ecològica també s'ha incrementat bastant. És per aquest fet que és interessant calcular la concentració de coure i per això cal disposar de mètodes analítics. Un excés de coure podria ser contraproductiu i afectar a la qualitat del vi obtingut de la vinya ja que si els nivells de coure superessin la capacitat assimilatòria dels llevats podria tenir lloc un problema de fermentació i posteriorment un nivell residual de coure al vi.

El coure és un micronutrient i les plantes el necessiten en petites quantitats. És requerit per a la formació de clorofil·la, per tant el nivell de coure afecta a la fotosíntesis. És essencial en les reaccions enzimàtiques i en les etapes reproductives. Està present en la lactasa i en diversos enzims i la seva presència en la citocrom oxidasa ha creat especulació pel seu paper fonamental en el metabolisme. També s'observa que el coure pot ser necessari en el metabolisme de proteïnes i carbohidrats i en la fixació de nitrogen.

La concentració normal en el teixit de la planta és aproximadament 4 – 30 mg Cu/g. Present a concentracions inferiors de 3 µg/g es produirà deficiència de coure, que es manifesta per fulles grogues i rissades. D'altra banda a concentracions superiors a 20 µg/g té lloc un fenomen de toxicitat per el coure, les fulles són de color groc i les arrels estan poc desenvolupades i amb freqüència descolorides.

El coure no acostuma a ser un paràmetre important en la caracterització del sòl i la seva importància més rellevant està en la fertilitat del sòl i en la nutrició de la planta. Per tant, les úniques anàlisis de coure que es realitzen són la determinació del coure total, la determinació del coure d'intercanvi i la determinació del coure biodisponible.

El coure total és el contingut de coure que hi ha a la terra en total, tenint en compte el d'intercanvi i el biodisponible. El coure biodisponible és el coure que està en el sòl en un estat en que la planta el pot absorbir directament sense cap procediment intermedi. El coure d'intercanvi és el coure que està enllaçat amb argila i humus, que són tipus de col·loides presents en el sòl, el qual pot arribar a la planta depenent de la seva capacitat d'intercanvi de cations (CIC).³

En l'intercanvi iònic es pot produir un intercanvi de cations mitjançant un equilibri entre l'adob i el sòl. Però el mètode més comú és el produït per efectes electrostàtics o per la presència de gradients de concentració. Els cations retinguts per efectes electrostàtics en la superfícies dels col·loides del sòl són els cations adsorbits per la planta, els quals poden ser intercanviats per uns altres cations presents en el sòl. Aquest procés d'intercanvi és el conegut com a intercanvi catiónic, el qual es pot observar en la Figura 2, i els cations que estan involucrats són els cations d'intercanvi.

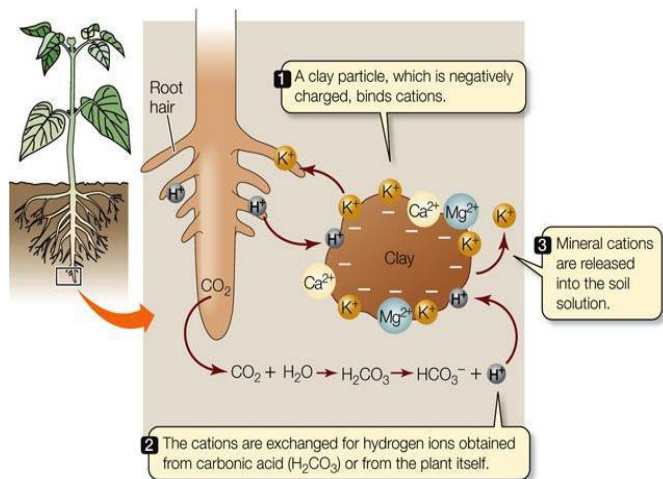


Figura 2. Intercanvi iònic

Com es pot observar a la Figura 2, l'intercanvi dels cations adsorbits en el col·loide i uns altres cations alliberats per la planta, ja sigui H^+ directament o precedents del CO_2 alliberat que forma àcid carbònic en continuació amb H_2O , finalment els cations d'interès per la planta s'alliberen i queden disponibles per a l'absorció per part de la planta.

La CIC està relacionada amb la composició del sòl, com més contingut tingui en col·loides el sòl més alta serà la CIC; les argiles estan negativament carregades i per atracció electrostàtica en la superfície de la argila són capaces d'adsorbir més cations, com es pot observar en la Figura 3. L'humus per altra banda està format per la descomposició de la matèria orgànica d'organismes i microorganismes beneficiosos, té una carrega positiva i una carrega negativa superior a la de l'argila. Aquesta capacitat de retenir i intercanviar cations és un indicador directe de la fertilitat del sòl.

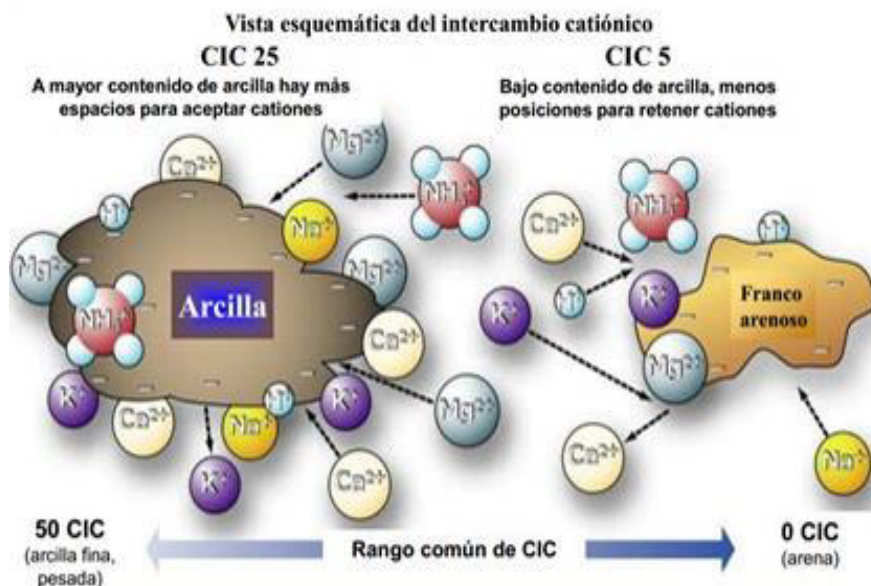


Figura 3. Relació del contingut d'argila en el sòl i la CIC

Els valors de CIC es mesuren en meq/100g de sòl, que en el Sistema Internacional aquesta mesura equival a $cmol(+)/kg$ de sòl. Depenent del tipus de col·loides presents en el sòl la CIC pot variar, per exemple hi ha argiles com la caolita que tenen un CIC de 3 – 15 meq/100 g, però hi ha argiles com la montmoril·lonita que tenen un CIC de 80-100 meq/100g. La matèria orgànica, en la qual el component majoritari és el humus, té un CIC de 200 – 400 meq/100 g. Un altre factor que pot fer variar la CIC és la textura del sòl⁴, com més argilós sigui, major CIC tindrà, com podem observar a la Taula 1.

Taula 1. Variació de la CIC depenent del material que forma el sòl

Material	CIC (meq/100 g)
Argiles	
Caolinita	3 – 15
Hal·loysita	5 – 10
Clorita	10 – 40
Il·lita	15 – 40
Montmoril·lonita	80 – 100
Vermiculita	100 – 150
Matèria Orgànica	200 – 400
Textura del sòl	
Arena	1 – 5
Franc arenós	5 – 10
Franc	5 – 15
Franc argilós	15 – 30
Argilós	>30

Un altre factor que afecta a la CIC és la saturació base, que indica la fracció de cations intercanviables; com major sigui el nombre de cations presents el pH del sòl es neutralitzarà a curt termini. Malgrat aquest fet, si els cultius han remogut la major part dels cations menys àcids, el sòl estaria baix en saturació de bases o alt en saturació àcida. Les quantitats totals de cations àcids relatives a la CIC són una mesura de la saturació àcida. Aquesta també és una mesura de les necessitats d'emblanquinat del sòl.

Com s'ha comentat anteriorment hi ha tres tipus de coure però des del punt de vista enològic els més importants són el d'intercanvi i el biodisponible, però en aquest treball es determinarà també el coure total. Per als tres tipus de coure la determinació es realitza per la mateixa tècnica analítica, l'espectroscòpia d'absorció atòmica en flama, però on difereix és en les diverses tècniques d'extracció dels cations de coure del sòl.

Hi ha diverses extraccions per al ions de coure:

- Extracció per el mètode del NH_4OAc
- Extracció per el mètode del EDTA
- Extracció per el mètode Mehlich-1
- Extracció per el mètode Mehlich-3

Les extraccions pel mètode del NH_4OAc , pel de Mehlich-1 són per a la determinació del coure d'intercanvi, la del EDTA és per la del coure biodisponible i per el mètode de Mehlich-3 es determina el coure total.

3. Objectiu

Aquest treball consta de dos objectius:

- La posada a punt d'uns mètodes per a la determinació dels tres tipus de Cu, el d'intercanvi, el disponible i el total en sols de vinya mitjançant espectroscòpia d'absorció atòmica.
- La determinació dels tres tipus de Cu en diverses mostres de sòls de Denominacions d'Origen de Catalunya de vins.

4. Fonaments

4.1 Espectroscòpia d'absorció atòmica en flama (AAS)

És una tècnica analítica de quantificació de metalls que està basada en el principi de que els àtoms lliures en estat fonamental poden absorbir llum a una certa longitud d'ona.

El primer pas és l'atomització de l'analit en matriu líquida, comunament s'utilitza un nebulitzador per a crear un boirum de mostra i un cremador amb forma de ranura que dóna una flama amb una longitud de trajecte més llarga. El boirum atòmic queda desolvatat i exposat a una energia a una determinada longitud d'ona emesa per la flama.

El nebulitzador i la flama s'utilitzen per a desolvatar i atomitzar la mostra, però l'excitació dels àtoms del analit s'aconsegueix mitjançant l'ús de làmpades a través de la flama a diverses longituds d'ona per a cada tipus d'analit. L'excitació s'ha de produir per afavorir el trencament de la molècula en els àtoms que la formen, aquesta excitació fa que els àtoms que l'inici tenen el seus electrons en el nivell atòmic més baix possible (estat fonamental) absorbeixin fotons d'energia exactament igual a la diferència d'energia entre nivells ΔE per així promocionar els seus electrons a nivells superiors. Aquest fonament s'observa en la Figura 4.

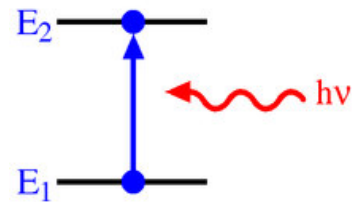


Figura 4. Absorció d'un fotó de l'estat fonamental (E₁) a l'estat excitat (E₂)

La flama ha de tenir una temperatura el suficientment elevada per a que els àtoms de la mostra no es desestabilitzin i per arribar a aquesta temperatura es fa ús de diferents mescleres de combustibles.

El feix de llum provinent de la làmpada, que és una font monocromàtica de radiació, després de passar per la flama continua fins a arribar a un monocromador, la funció del qual és seleccionar una de les longituds d'ona emeses. Aquesta llum un cop passat el monocromador serà la que determina la quantitat d'analit existent a la mostra mitjançant un detector, en el cas d'aquest treball s'ha utilitzat el detector d'estat sòlid segmentat. Del detector les dades passen a un processador de dades. A la Figura 5 s'observa un diagrama del funcionament de un espectròmetre d'absorció atòmica en flama.

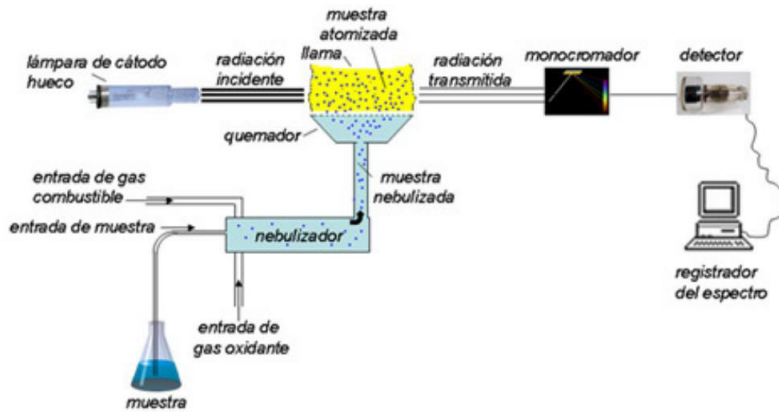


Figura 5. Diagrama del funcionament de un espectròmetre d'AAS

4.2 Mètodes d'extracció⁴

4.2.1 Mètode d'acetat amònic

El mètode de l'acetat amònic (NH_4OAc) és el més comú en la determinació de cations d'intercanvi i en la CIC dels sòls. Es tracta de l'intercanvi de cations absorbits per la terra per els ions amoni de la pròpia solució, que és una solució de NH_4OAc 1 M a un $\text{pH}=7$, degut a la elevada concentració dels ions NH_4^+ es produeix un gradient de concentració en els cations de la terra i es realitza l'intercanvi, al finalitzar aquest procés s'obtenen els cations lliures en la solució.

4.2.2 Mètode d'EDTA

El mètode de l'EDTA és un mètode per a determinar els cations disponibles. Per a aquest propòsit s'utilitzen agents quelants com l'EDTA, el DTPA, l'EDDHA, etc. Aquests mètode esta basat en la complexació simultània dels cations amb l'agent quelant, en el nostre cas una solució de EDTA 0.05 M portada a $\text{pH}=7$.

4.2.3 Mètode de Mehlich-1

És un mètode per a la determinació del coure d'intercanvi basada en una solució establerta per Adolf Mehlich al 1953, també és coneguda amb el nom de doble àcid. És una mescla d'àcids de 0.05 N de HCl i de 0.025 N de H_2SO_4 la qual estava desenvolupada per extracció dels cations més comuns per la seva alta concentració però avui en dia també s'utilitza en la determinació de micronutrients.

4.2.4 Mètode de Mehlich-3

La solució de Mehlich-3 és una combinació de 5 reactius en les següents concentracions:

- Àcid acètic (CH_3COOH) 0.2 N
- Nitrat amònic (NH_4NO_3) 0.25 N
- Fluorur de amoni (NH_4F) 0.015 N
- Àcid nítric (HNO_3) 0.013 N
- EDTA 0.001 M

Aquesta és una millora de la solució de Mehlich-2, una solució que comportava uns residus molt contaminants. Conté amoni per a l'intercanvi catiònic i també EDTA per a complexar amb els cations gracies al seu paper com agent quelant. La funció dels dos àcids és la de mantenir un pH àcid per evitar possibles precipitacions.

Aquesta solució té una capacitat d'extracció molt forta, degut a aquest fet no es pot treballar amb material de vidre pyrex ja que la majoria d'aquests materials contenen òxids de sodi, encara que sigui en una petita porció, i la solució extreu el sodi del vidre si està un determinat temps. Per això l'emmagatzematge de les mostres i tot es realitza en envasos de plàstic, l'únic material que s'utilitza de vidre és el embut ja que és un procés de filtració ràpid i els vasos de precipitats ja que també s'utilitzen en un curt període de temps. També es podrien utilitzar envasos fets amb polímers *commodity*.

5. Part experimental

5.1 Presa de mostra i pretractament

Respecte a la presa de mostra en el centre del INCAVI hi han dues formes de realització. En una de elles, els mateixos treballadors són els responsables de realitzar l'obtenció mitjançant un procediment i en són els propis clients del INCAVI els responsables de portar la mostra de terra al centre.

Per procedir correctament en aquest procés als clients se'ls dona unes pautes a seguir per a la presa de mostra adequada, és a dir per a que la mostra portada tingui una bona representativitat.

Per a una presa de mostra correcta es necessiten com a mínim 5 punts del terreny en concret, tant de sòl com de subsòl. Aquests punts es poden escollir mitjançant dos patrons, el patró en Z o el patró en X, els quals observem a la Figura 6.

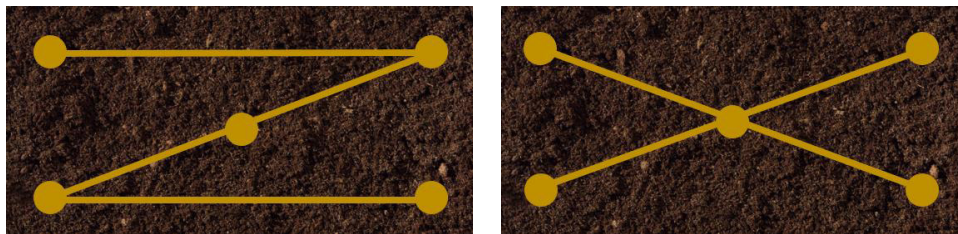


Figura 6. Esquerra patró en Z, dreta patró en X

En parcel·les on a vista es veuen diferents es realitza la presa de mostra com si hagués dues parcel·les i en el cas que a la parcel·la hi haguessin clapes també s'actuarià com a dos parcel·les diferents, en aquests dos casos s'actua com a la Figura 7.

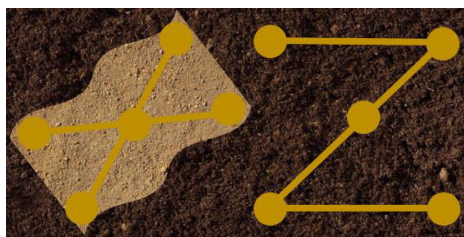


Figura 7. Patró en parcel·les diferents

Un cop decidit els punts de sòl i subsòl s'extreu terra dels primers 20 cm de cada punt, aquesta és la terra del sòl, per a extreure la terra del subsòl es necessita una barrina en la qual s'arriba fins a 80-100 cm de profunditat. Les mostres obtingudes es recullen en bosses de plàstic.

En el cas que alguna mostra fos homogènia amb una altra es podrien ajuntar, com també es pot donar el cas de que totes les mostres de sòl siguin homogènies i es podrien mesclar ja que a simple vista pareix que tinguin la mateixa composició.

En el cas de que el client vulgui realitzar més preses de mostra, per que per exemple el seu terreny tingui una expansió gran, s'ha d'actuar amb els mateixos patrons però afegint més punts.

Posteriorment es procedeix a començar en el procés de pretractament on el primer pas és traspasar la mostra de les bosses de plàstic a safates d'alumini fins que aquestes estiguin plenes fins a dalt.

Aquestes safates es porten a l'estufa on estaran un període de 2 dies a una temperatura de 60.0 °C, aquest període és el de passar la mostra de terra humida a una mostra seca, ja que els valors de CIC es donen en unitats de matèria seca.

Un cop obtinguda la mostra seca es passa per la trituradora per a obtenir uns grànuls de mostra petits i així triturar possibles pedres o arrels que tingui la mostra. A continuació el recollit de la trituradora es filtra mitjançant un filtre granulat de 2 mm, per a obtenir el filtrat sota del filtre granulat es col·loca un paper i un cop acabat de filtrar es passa el filtrat del paper a un envàs de plàstic per al seu emmagatzematge.

5.2 Materials emprats

Els materials emprats en les extraccions són els següents, en cada procediment d'extracció estan especificats.

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| • Balança analítica Mettler AE 200 | • Vas de precipitats de 50 ml |
| • Granetari MonoBloc PB300-2 | • Vas de precipitats de 100 ml |
| • pH-metre Crison | • Vas de precipitats de 250 ml |
| • Agitador magnètic | • Vas de precipitats de 500 ml |
| • Paper de filtre Whatman nº2 | • Vas de precipitats de 1000 ml |
| • Peu | • Matràs aforat de 25 ml |
| • Pinces | • Matràs aforat de 100 ml |
| • Nou | • Matràs aforat de 1000 ml |
| • Embut alemany | • Matràs aforat de 2000 ml |
| • Comptagotes | • Pipeta graduada de 2 ml |
| • Parafilm | • Pipeta graduada de 5 ml |
| • Safata | • Pipeta graduada de 10 ml |
| • Paquet de gel | • Pipeta graduada de 20 ml |
| • Proveta de 100 ml | • Envàs de poliestirè de 1000 ml |
| • Proveta de 1000 ml | • Envàs de poliestirè de 2500 ml |
| • Xeringa de polietilè de 30 ml | • Tubs de poliestirè de 50 ml |

5.3 Extracció en NH_4OAc ^{5,6}

5.3.1 Reactius

- Acetat d'amoni ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$, NH_4OAc); Chem-lab puresa $\geq 99\%$
- Àcid acètic glacial (CH_3COOH); J.T. Baker puresa $\geq 99\%$
- Amoníac 25% (NH_3); Panreac
- H_2O destil·lada

5.3.2 Preparació de la solució de NH_4OAc

Per a la preparació de la solució es pesen 77.0800 g de NH_4OAc en la balança analítica dins d'un vas de precipitats de 250 ml i es dissolen en aigua destil·lada fins a un volum de 200 i s'afegeix la solució resultant a un vas de 1000 ml, es renta el vas de 250 ml amb aigua destil·lada i es porta la solució del vas de 1000 ml fins a un volum de 800 ml. A continuació s'afegeix un imant al vas de precipitats i es porta a agitació magnètica fins dissoldre el NH_4OAc , s'afegeix aigua fins arribar a un volum de solució pròxim a 1000 ml sense aproximar-se massa a aquest volum.

El següent pas consisteix en mesurar el pH de la solució resultant, la qual inicialment té un pH bàsic, i es porta a un pH de 7 mitjançant l'addició en un comptagotes de CH_3COOH per a baixar el pH, en el cas de que s'arribés a un pH inferior a 7 s'ajustaria mitjançant NH_3 afegit en un comptagotes.

Quan s'arriba a un pH de 7 es porta la solució resultant a un matràs aforat de 1000 ml i s'enrasa en aigua destil·lada, un cop enrasat es porta a un envàs de poliestirè de 1000 ml per al seu emmagatzemament. D'aquesta manera tenim una solució amb una concentració 1 M.

5.3.3 Procediment d'extracció

El primer pas per a la realització del procés d'extracció és pesar 5.00 g de la mostra de sòl en el granetari en un vas de 100 ml i se li afegeix 50 ml de la solució 1 M de NH_4OAc mitjançant l'ús d'una proveta.

En aquest vas s'introdueix un imant i es porta al agitador magnètic durant 2 hores i al cap d'aquest temps es tapa el vas amb un vidre de rellotge i es deixa reposar fins l'endemà. L'endemà es torna a agitar durant 30 minuts i es porta a filtrar.

La filtració es realitza mitjançant un embut alemany amb un filtre de plecs de paper de filtre Whatman nº2 i es recull el filtrat en matrassos aforats de 100 ml, un cop filtrat el contingut del vas es renta aquest amb més solució i es torna a filtrar. Aquest últim pas es repeteix fins a enrasar el matràs.

Un cop enrasat es tapa i s'analitza.

5.4 Extracció en EDTA⁴

5.4.1 Reactius

- Àcid etilendiamintetraacètic ($C_{10}H_{16}N_2O_8$, EDTA); Panreac pureza $\geq 99\%$
- Àcid etilendiamintetraacètic sal disòdica dihidratada ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, Na_2 -EDTA); Sigma pureza $\geq 99\%$
- Àcid acètic glacial (CH_3COOH); J.T. Baker pureza $\geq 99\%$
- Amoníac 25% (NH_3); Panreac
- H_2O destil·lada

5.4.2 Preparació de la solució de EDTA

Per a la preparació de la solució s'utilitza un vas de precipitats de 250 ml on es pesen 14.6120 g de EDTA mitjançant la balança analítica, també es podria realitzar en Na_2 -EDTA en el cas que no es disposi d'EDTA ja que aquest realitzaria la mateixa extracció que el EDTA. Aquest contingut de EDTA es dissol en aigua destil·lada i es traspassa a un vas de precipitats de 1000 ml, es neteja el vas de 250 ml amb aigua destil·lada i es traspassa al vas de 1000 ml.

S'afegeix aigua destil·lada fins arribar a un valor pròxim a 1000 ml i un imant i és porta al agitador magnètic on amb l'ajut de un pH-metre es fa una lectura del pH. S'ajusta a pH 7 mitjançant l'ús de CH_3COOH , en el cas que es vulgui baixar el pH, i NH_3 , en el cas que es vulgui pujar el pH.

Per acabar es traspassa la solució del vas de precipitats de 1000 ml a un matràs aforat de 1000 ml i s'enrasa amb aigua destil·lada, aquesta solució es traspassa novament a un envàs de poliestirè de 1000 ml per al seu emmagatzematge. La concentració final d'aquesta solució es de 0.05 M.

5.4.3 Procediment de extracció

Per a l'extracció d'aquest mètode es pesen 5.00 g de terra en un vas de precipitats de 50 ml mitjançant un granetari i en aquest vas se li afegeixen 15 ml de la solució anteriorment preparada, els quals han estat mesurats mitjançant una proveta de 100 ml.

En aquest vas se li introdueix un imant i es porta a agitació mitjançant un agitador magnètic durant 1 hora. Un cop transcorregut aquest període d'agitació és procedeix a filtrar mitjançant un embut alemany i un filtre de plecs de paper Whatman nº2, es recull el filtrat en matrassos aforats de 25 ml. Un cop passat tot el filtrat del vas se li afegeix més solució de EDTA 0.05 M per a netejar el vas fins a enrasar el filtrat als 25 ml del matràs aforat.

Finalment es tapen els matrassos i s'emmagatzemen per al seu posterior anàlisi.

5.5 Extracció en Melich-1⁴

5.5.1 Reactius

- Àcid clorhídric 37 % (HCl); Scharlau
- Àcid sulfúric (H₂SO₄), Scharlau puresa 96-98 %
- Carbó actiu; Panreac químicament pur
- H₂O destil·lada

5.5.2 Preparació de la solució de Melich-1

El primer pas en aquesta preparació és afegir 7.3 ml de HCl, mesurats amb una pipeta graduada de 10 ml, a un matràs aforat de 2000 ml. A continuació s'introdueixen 1.2 ml de H₂SO₄, mesurats amb una pipeta graduada de 5 ml i també s'afegeix 1500 ml de aigua destil·lada.

El matràs en la solució resultant es porta a un bany de aigua freda (el qual es realitza afegint aigua a una safata i 2 paquets de gel) i es deixa el matràs fins que es refredi.

Un cop refredat s'afegeix aigua destil·lada fins a un volum de solució resultant de 1800 ml. Aquesta solució es traspassa a un envàs de poliestirè de 2500 ml per al seu emmagatzematge.

5.5.3 Procediment de extracció

Per a l'extracció en aquest mètode es pesen 0.4000 g de carbó actiu mitjançant una balança analítica en un vas de precipitats de 250 ml i posteriorment s'hi afegeixen 10.00 g de terra mitjançant un granetari. Posteriorment se li afegeix al vas 40 ml de la solució de Mehlich-1 mesurats mitjançant una proveta de 100 ml juntament en un imant i es porta a agitació en un agitador magnètic durant 10 minuts.

El proper pas és recollir la solució del vas agitada i traspassar-la a un tub de centrifuga per a portar aquests tubs a centrifugar, el programa en que es realitza aquesta centrifugació és 15 minuts a 2000 rpm.

Posteriorment es porta a filtrar la solució centrifugada mitjançant un embut alemany i un filtre de plecs de paper Whatman nº2, es van realitzar diverses variacions del mètode per a la optimització d'aquest mètode:

- El filtrat obtingut es recull en matrassos aforats de 100 ml i un cop acabat de filtrar es porta al volum d'enras mitjançant aigua destil·lada.
- El filtrat obtingut es recull en matrassos aforats de 100 ml i un cop acabat de filtrar es porta al volum d'enras mitjançant la pròpia solució de Mehlich-1
- El filtrat obtingut es recull en tubs de polipropilè sense enrasar a cap volum.

5.6 Extracció en Melich-3⁴

5.6.1 Reactius

- Àcid etilendiamintetraacètic ($C_{10}H_{16}N_2O_8$, EDTA); Panreac puresa $\geq 99\%$
- Àcid acètic glacial (CH_3COOH); J.T. Baker puresa $\geq 99\%$
- Àcid nítric 65% (HNO_3); Scharlau
- Nitrat d'amoni (NH_4NO_3); Probus puresa $\geq 99\%$
- Fluorur d'amoni (NH_4F); Probus químicament pur
- H_2O destil·lada

5.6.2 Preparació de la solució de Mehlich-3

La preparació de la solució de Melich.3 consta de dos parts, la primera part on es realitza una solució intermèdia i la segona part que és quan s'acaba de preparar.

Per a la solució intermèdia es pesen 69.4 g de NH_4F en un vas de precipitats de 500 ml a la balança analítica, un cop pesats es dissolen en 300 ml de aigua destil·lada agafats en una proveta de 1000 ml i s'agita fins la completa dissolució del NH_4F . A la solució resultant se li afegeixen 36.5 g d'EDTA els quals han estat pesats a la balança analítica dins d'un vas de precipitats de 250 ml, el vas que conté el EDTA es renta en aigua per arrastrar possibles traces. La solució resultant es traspassa a un matràs de 500 ml on s'enrasa en aigua destil·lada. Aquesta solució posteriorment es porta a un envàs de poliestirè de 1000 ml per al seu emmagatzematge.

Per al segon pas de la preparació es pesen 20 g de NH_4NO_3 en un vas de 250 ml mitjançant la balança analítica i es dissolen en aigua destil·lada per a traspasar la solució resultant a un vas de precipitats de 1000 ml. Es renta el vas amb aigua destil·lada i es traspassa al vas de 1000 ml. S'afegeix aigua destil·lada fins arribar a un volum de 500 ml.

Posteriorment amb l'ajuda d'una pipeta graduada de 5 ml s'afegeixen al vas 4 ml de la solució intermèdia de NH_4F i EDTA, amb una pipeta graduada de 20 ml s'afegeixen 11 ml de CH_3COOH i amb una pipeta graduada de 2 ml s'afegeixen 0.82 ml de HNO_3 .

A la solució resultant se li afegeix aigua destil·lada fins aproximar-se al volum de 1000 ml i en aquest punt es traspassa a un matràs aforat de 1000 ml, on s'enrasa en aigua destil·lada. Posteriorment es traspassa aquesta solució a un envàs de poliestirè de 1000 ml per al seu emmagatzematge.

5.6.3 Procediment de extracció

Per a la realització l'extracció en aquest mètode es pesen 2.50 g de terra al granetari en un vas de precipitats de 100 ml. S'afegeix 25 ml de la solució de Mehlich-3 mesurats amb una xeringa de polietilè, s'introdueix un imant al vas i es porta al agitador magnètic durant 5 minuts.

Un cop a transcorregut aquest temps es porta a filtrar la solució en un embut alemany i amb un filtre de plecs de paper Whatman nº2 i el filtrat es recull amb tubs de poliestirè de 50 ml. Un cop filtrada completament la solució es tapa el tub sense enrasar la solució i s'emmagatzema per al seu posterior anàlisi.

5.7 Patrons de la recta de calibratge per la lectura en AAS

5.7.1 Reactius

- Solució estàndard de coure 1.000 ± 0.002 g/l AA; Panreac
- H₂O destil·lada
- H₂O destil·lada millipore

5.7.2 Material

- Matràs aforat de 100 ml
- Matràs aforat de 50 ml
- Pipeta graduada de doble enras de 5 ml
- Pipeta aforada de 5 ml
- Tub de poliestirè de 50 ml

5.7.3 Preparació de les solucions patró

Per a la preparació de les solucions patró es comença realitzant una solució mare de 50 ppm de la solució estàndard de coure. Aquesta solució es prepara agafant 2.5 ml de la solució estàndard mitjançant una pipeta aforada de 5 ml i s'afegeixen a un matràs aforat de 50 ml i s'enrasa fins als 50 ml en aigua destil·lada.

Posteriorment es realitzen les solucions els 5 punts de la recta a partir de la solució mare afegint un cert volum de la solució mare i enrasar fins al volum de 50 ml. Els volums de la solució mare es poden observar en la taula 2.

Taula 2. Preparació dels punts de la recta de calibratge

Concentració (ppm)	Volum solució mare (ml)
0.00	0.00
0.25	0.25
0.50	0.50
1.00	1.00
2.50	2.50

Per acabar s'introdueixen totes les solucions en tubs de poliestirè de 50 ml per a la seva anàlisi.

S'ha de tenir en compte que els patrons de coure tenen un curt termini d'estabilitat, per tant just acabats de preparar s'han d'analitzar.

En tots els altres mètodes es va realitzar un estudi de comparació entre els resultats obtinguts en la recta realitzada en aigua i en la recta realitzada en la pròpia solució extractora per a determinar un possible efecte matriu.

5.8 Anàlisis per espectroscòpia d'absorció atòmica

5.8.1 Material i instrument

- Pipeta aforada de 10 ml
- Tubs de polipropilè de 10 ml
- Dosímetre 725 Dosimat; Metrohm
- AAnalyst 400 Atomic Absorption Spectrometer; Perkin Elmer
- Mostrejador automàtic S10 Autosampler; Perkin Elmer

5.8.2 Condicions experimentals

La longitud d'ona on es van realitzar totes les determinacions del coure va ser a 324.75 nm i la mescla de gasos va ser igual en tots els mètodes també, la qual va ser una mescla d'acetilè : aire de 2,5:10,0, en aquesta flama es treballa a una temperatura de 2100-2400 °C.

El procediment estàndard que donava l'aparell eren 10 s de rentat entre mostra i mostra i 15 s de lectura per a cada mostra, es van realitzar unes proves i es va decidir augmentar per a tots els mètodes el temps de rentat a 15 s i el temps de lectura a 30 s. Aquesta variació es va introduir per evitar efecte memòria.

5.8.3 Procediment del anàlisi

Per a l'anàlisi de les solucions obtingudes s'omplen tubs de polipropilè de 10 ml mitjançant una pipeta aforada de 10 ml.

En el cas de que hi hagués una mostra que tingues una concentració de coure més elevada que la nostra recta de calibratge s'estudiaria quina dilució realitzar i s'utilitzaria el dosímetre. Per al mètode del EDTA es va haver de realitzar una dilució 1:10 per a algunes mostres.

Un cop es té la mostra al tub es porta al mostrejador automàtic que està connectat al espectròmetre.

Un cop tenim totes les mostres a punt al mostrejador automàtic és quan es comencen a preparar les solucions patró per a la recta de calibratge com s'ha descrit a l'apartat 6.6.

Per a realitzar l'anàlisi s'utilitza el programa WinLab 32, el qual ens permet controlar els aspectes clau de l'anàlisi i dona una resposta instrumental realitzant una regressió de mínims quadrats a partir de la resposta donada per els patrons.

A la mostra de 0 ppm se li assigna el valor de zero mitjançant un auto-zero i juntament en les altres mostres s'obté una recta de calibratge lineal univariant del tipus $y=b_1 \cdot x + b_0$, on:

$$Abs\ donada = b_1 \cdot Concentració\ (ppm) + b_0$$

Per a acceptar aquesta recta s'utilitzen dos factors:

- Coeficient de correlació (R^2): es compara en els obtinguts anteriorment, però per norma general si es un valor inferior a 0.99 no s'accepta
- Pendent de la recta: es realitza una comparació de la pendent obtinguda en pendents anteriorment obtingudes, si són del mateix ordre es pot acceptar aquesta recta si el coeficient de correlació és de un valor acceptable.

En el cas de que la recta de calibratge no es pogués acceptar es realitzaria una nova recta amb els mateixos patrons i si aquesta no s'acceptés es realitzarien nous patrons per a tornar-los a analitzar per a fer una nova recta de calibratge.

5.9 Mostres utilitzades

En aquests treball s'han utilitzat dos tipus de mostres: les mostres de les Denominacions d'Origen de Catalunya i unes mostres adicionades, a continuació es procedeix a la descripció d'aquests grups de mostres.

5.9.1 Mostres adicionades

Es van realitzar preses de mostra de terres d'un pati on no s'ha realitzat cap tractament a la terra. Aquestes mostres es van obtenir mitjançant el procediment explicat en el punt 5.1 i les extraccions com les comentades en els punts 5.2, 5.3, 5.4 i 5.5. Es van afegir 2.4 kg de terra en 5 recipients de plàstic.

Es van addicionar unes concentracions conegudes d'una solució de 150 mg Cu/kg de matèria seca de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ mitjançant un dosificador en esprai, les addicions són 0.00, 24.00, 48.02, 78.06 i 150.00 mg Cu/kg de matèria seca, els volums que s'han d'addicionar per a obtenir aquestes concentracions són 0, 4, 8, 13 i 25 ml respectivament. Un cop addicionat aquests volums en cada recipient i deixant-ne un sense addicionar per a que fes de blanc es va homogeneïtzar cada un i es va deixar passar un temps de 2 setmanes.

Passat aquest temps es va remenar cada recipient i es va repartir les terres en dues safates per portar a assecar. Els següents passos són els descrits en el punt 5.1.

Les mostres es van anomenar segons el volum afegit, per tant el nom de les mostres es el representat en la taula 3.

Taula 3. Mostres adicionades

• 0 Cu 1	• 4 Cu 1	• 8 Cu 1	• 13 Cu 1	• 25 Cu 1
• 0 Cu 2	• 4 Cu 2	• 8 Cu 2	• 13 Cu 2	• 25 Cu 2

5.9.2 Mostres de Denominacions d'Origen Catalunya

Per a la posta a punt del mètode de determinació del coure es van estudiar diverses mostres de la DO Penedès, concretament de la zona de la comarca del Alt Penedès, ja que en el procés de la recerca bibliogràfica es van obtenir uns valors de referència d'aquesta zona⁷.

També es va estudiar un patró de terres del qual es té una concentració dels cations més comuns en el sòl, però de coure no es coneix. Les mostres que es van emprar en la posada a punt del mètode són les observades en la taula 4:

Taula 4. Mostres de les Denominacions d'Origen de Catalunya

• Patró A-20	• 4433	• 4434	• 4435
• 4470	• 4471	• 5054	• 5314

Totes les mostres són d'una textura franca, menys la 5054 que es una mostra franca argilosa, aquest fet varia la CIC. Per la mostra 5054 s'espera unes concentracions de Cu d'intercanvi major que les de Cu disponible, per a les altres mostres s'espera el contrari.

5.10 Expressió de resultats

Un cop acabat l'anàlisi al resultat obtingut se li ha de restar el efecte del blanc i se li ha de desfer la dilució en el cas que hagués segut realitzada:

$$[mostra] donada - Mitjana [blanc] = [mostra] sense efecte blanc$$

$$[mostra] sense efecte blanc * Dilució de la mostra = [mostra] en \frac{mg Cu}{l sol.}$$

El programa dona els resultats en unes unitats de mg Cu/l de la solució obtinguda de la extracció, però el resultat es referencia amb la terra i hi ha dues formes d'expressar els resultats:

- Passar de mg Cu/l a mg Cu/kg mostra seca (ppm en massa)

$$\frac{mg Cu}{l sol.} \cdot \frac{Vol. extracció (l)}{pes mostra terra seca (g)} \cdot \frac{1000 g mostra}{1 kg mostra} = \frac{mg Cu}{kg mostra seca}$$

- Passar de mg Cu/l a meq de Cu/100 g de mostra

$$\frac{mg Cu}{l sol.} \cdot \frac{1 mmol Cu}{63546 mg Cu} \cdot \frac{1 meq Cu}{1 mmol Cu} \cdot \frac{Vol. extracció (l)}{pes mostra seca (g)} = \frac{meq}{1 g} \cdot 100 = \frac{meq}{100 g}$$

Es va passar els resultats obtinguts a aquestes unitats però totes donaven del ordre de 10^{-5} , per tant es va descartar la opció d'expressar els resultats en aquestes unitats.

5.11 Càlculs i eines estadístiques

Per a la detecció de possibles punts outliers es va utilitzar el test de Grubbs ja que es el recomanat per la ISO 5725-2:1994⁸

Es va calcular la recuperació, la repetibilitat i la incertesa dels resultats. També es va realitzar un test ANOVA per poder mirar si hi ha diferències significatives en entre els mètodes. El procediment emprat es el exposat a continuació:

5.11.1 Test de Grubbs

Es realitza una comparació dels valor de la G tabulada per a un nivell α i $n-1$ graus de llibertat i de la G calculada, si la G calculada és menor de la G tabulada el punt en concret no es un punt discrepant. L'equació 1 representa el càlcul de la G calculada.

Equació 1. Càlcul de la G calculada

$$G_{cal} = \frac{|X_n - \bar{X}|}{S}$$

On $\bar{x}$ es el valor mitjà dels n resultats i s es la desviació estàndard dels n resultats.

Aquest test es va realitzar per a tots els mètodes en la selecció de dades.

5.11.2 Test t de Student per a la comparació de mètodes

Per estudiar un possible efecte matriu en els mètodes es realitza un assaig on es compara mitjançant un test t de Student les respostes obtingudes per a una recta de calibratge realitzada en aigua i una realitzada en la pròpia solució extractora.

Per a aquest procediment es determinen dues extraccions per duplicat de la mateixa terra i es calcula el valor de la t calculada mitjançant l'equació 2.

Equació 2. Càlcul de la t calculada

$$t_{calculada} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\sqrt{n}}$$

On $\bar{x}$ és la diferència entre mitjanes de cada mostra per als dos mètodes, μ té un valor de 0 que és l'esperat per a que no hi hagin diferències entre mètodes i n es el nombre de mostres estudiades.

Aquest valor es compara en la t de Student tabulada de 1 cua per a una $\alpha=0.05$ i uns graus de llibertat de $n-1$.

5.11.3 Test ANOVA

Per a realitzar el càlcul del test ANOVA es realitzen diverses extraccions i es comparen els valors obtinguts per a les mateixes mostres. En aquest cas es realitza un test ANOVA de un factor⁹, on el factor que s'estudia són les diverses extraccions per a cada mètode. El test s'ha realitzat mitjançant el test estadístic Excel, la funció d'aquest test és efectuar una comparació de les mitjanes dels mètodes per a determinar si hi han diferències significatives entre els mètodes. Per a poder afirmar que no hi han diferències significatives el valor de la F calculada ha de ser menor a la F tabulada. Si el valor calculat fora major que el tabulat si que hi haurien diferències significatives entre mètodes. La taula de resultats del ANOVA que s'obté és la taula 5.

Taula 5. Taula de resultats del ANOVA de un factor

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	SSA	a-1	$MSA = \frac{SSA}{a-1}$	$\frac{MSA}{MSB}$		F_{tab}
Dins dels grups	SSB	N-a	$MSB = \frac{SSB}{N-a}$			
Total	SST	N-1				

On a és el nombre de extraccions realitzades i N el nombre de valors, per a l'obtenció del valor de la F tabulada es mira la taula de una cua per a $\alpha=0.05$ i a-1 i N-1 graus de llibertat.

5.11.4 Recuperació

Per al càlcul de la recuperació es van estudiar els resultats obtinguts de les mostres adicionades com s'ha comentat en el punt 5.9.2. Un cop obtingut el resultat en ppm en massa es procedeix a realitzar el càlcul de l'equació 3:

Equació 3. Càlcul de la recuperació

$$\text{Recuperació} = \frac{\text{Conc. mostra adicionada} - \text{Conc mostra sense adicionar}}{\text{Conc. adicionat}}$$

5.11.5 Repetibilitat

La repetibilitat¹⁰ es mesura mitjançant la mitjana de les p variàncies que estimen la variabilitat interna. On la variabilitat interna (S_w) per a cada una de les p condicions s'obté com la desviació estàndard de les n mesures de cada condició, com s'observa en l'equació 4.

Equació 4. Càlcul de la repetibilitat

$$r = \sqrt{\frac{S_w^2}{p}} = \sqrt{\frac{\left(\sum \sqrt{\frac{x_i - \bar{x}}{n-1}}\right)^2}{p}}$$

5.11.6 Incertesa

Per al càlcul de la incertesa el primer pas es realitzar el càlcul de la incertesa degut a la recta de calibratge, la equació corresponent per a aquest càlcul es l'equació 5:

Equació 5. Càlcul de la incertesa de la recta de calibratge

$$U(C_{recta}) = \frac{S_e}{b_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_{mostra} - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

On N es el nombre de repeticions de la mostra problema, n es el nombre de solucions patró utilitzades en la construcció de la recta, $\hat{y}_{mostra}$ es el valor mig de les N respostes instrumentals mesurades de la mostra problema, $\hat{y}$ es el valor mig de les n respostes instrumentals dels patrons de calibratge, $\bar{c}$ es el valor mig de les n concentracions dels patrons de calibratge, c_i es cadascuna de les n concentracions dels patrons de calibratge, s es la desviació estàndard dels residuals de la recta i b_1 es el pendent de la recta de calibratge.

Un cop obtingut el valor de la incertesa de la recta de calibratge es procedeix a realitzar la combinació de totes les fonts d'incertesa. Aquestes fonts són diferents per a cada extracció degut a que no s'utilitza a totes el mateix material. En aquest punt és on s'introdueix també el factor de la incertesa de la extracció, el qual s'obté a partir de les recuperacions de cada mètode. La combinació d'incerteses pren la forma general de l'equació 6.

Equació 6. Forma general de l'equació de combinació d'incerteses

$$u(C_{analit}) = C_{analit} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C_{recta})}{C_{recta}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_n)}{V_n}\right)^2 + \left(\frac{u(granatari)}{pesada}\right)^2 + \left(\frac{s(recu.)}{recu.}\right)^2}$$

Per a l'obtenció de la incertesa dels resultats aquest valor de incertesa combinat s'ha de multiplicar per el factor k, com s'observa en l'equació 7:

Equació 7. Obtenció de la incertesa

$$U = \pm k \cdot u(C_{analit})$$

on k ve de la taula t de Student per els següents graus de llibertat $t_{(1-\alpha, n-2)}$

6. Resultats i discussió

6.1 Mètode del NH_4OAc

El primer pas va ser realitzar un assaig per a determinar un possible efecte matriu, aquest assaig es va realitzar calculant la concentració de les mostres de sòls per duplicat fent la recta de calibratge en aigua i en la pròpia solució de NH_4OAc , els resultats que es van obtenir es poden observar a la taula 6.

Taula 6. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del NH_4OAc en diferents rectes de calibratge

Terres	Recta en NH_4OAc	Recta en H_2O
P A-20	2.06	<LOQ
	3.57	0.63
4433	5.32	2.34
	6.71	1.63
4434	5.74	0.96
	7.35	1.63
4435	6.68	0.86
	8.91	2.47
4470	5.62	0.72
	7.09	1.63
4471	5.72	2.68
	6.13	9.09
5054	3.06	2.58
	3.39	1.59
5314	3.52	0.16
	5.53	1.45

A simple vista s'observa que els valor no tenen repetibilitat, com per exemple en la mostra 4433 la mitjana de la recta en NH_4OAc és 6.01 mentre que en la recta en H_2O és 1.98. Totes les mostres tenen una diferència entre mitjanes gran, per tant, s'observa que hi ha diferències entre els mètodes. Aquest fet pot ser degut un efecte matriu per tant, tots els resultats es calcularan mitjançant la recta de calibratge feta en la solució de NH_4OAc .

A continuació es van determinar les mostres de terres adicionades per triplicat, els valors obtinguts són els representats en la taula 7.

Taula 7. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres adicionades extretes en el mètode del NH_4OAc

Terres	Extracció 1	Extracció 2	Extracció 3
P A -20	0.81	0.38	< LOQ
	0.72	0.70	< LOQ
0 Cu 1	0.83	0.68	0.21
	0.72	1.22	0.25
0 Cu 2	1.27	0.54	< LOQ
	0.88	0.70	0.37
4 Cu 1	3.74	1.16	0.89
	3.58	2.08	1.69
4 Cu 2	3.24	3.68	1.91
	3.06	4.24	4.21
8 Cu 1	7.69	10.66	5.43
	7.36	11.02	7.23
8 Cu 2	14.58	7.46	5.65
	14.44	7.88	8.59
13 Cu 1	15.19	10.54	11.99
	15.06	11.10	14.95
13 Cu 2	12.42	12.14	11.83
	12.22	11.34	14.27
25 Cu 1	29.04	40.28	35.93
	28.64	41.65	32.11
25 Cu 2	41.98	48.68	46.73
	41.42	49.64	52.79

Es va realitzar un test ANOVA de un factor i d'aquest test es van obtenir els resultats de la taula 8.

Taula 8. Test ANOVA per a les mostres adicionades extretes en el mètode del NH_4OAc

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	12.12	2	6.06	0.0268	0.9736	3.1428
Dins dels grups	14250.30	63	22,20			
Total	14262.42	65				

El valor de la F calculada per a les extraccions és 0.0268 mentre que el valor tabulat és 3.1428, per tant al ser el valor de la F calculada menor que el de la F tabulada no hi han diferències significatives entre cada extracció.

En els valors obtinguts es va procedir a realitzar un estudi de la recuperació del mètode mitjançant l'equació 3. Els resultats obtinguts estan representats en la taula 9.

Taula 9. Estudi de la recuperació de les mostres adicionades per el mètode del NH_4OAc

Terra	Mitjana concentracions (mg/kg)	Afegit (mg/kg)	Recuperació (%)
0 Cu	0.64	0.00	
4 Cu	2.79	24.00	8.96
8 Cu	9.00	48.02	17.41
13 Cu	12.75	78.06	15.52
25 Cu	40.74	150.00	26.73

Es van obtenir uns percentatges de recuperació molt dispersos, podria ser degut a la baixa concentració de coure en els sòls i a la poca homogeneïtat de la mostra.

Un cop realitzat el test ANOVA i el càlcul de les recuperacions es va procedir a realitzar dues extraccions diferents i a determinar la quantitat de coure de les mostres de les DO de Catalunya per el mètode del NH_4OAc , els resultats de les mostres es veuen reflectits en la taula 10.

Taula 10. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del NH_4OAc

Terres	Extracció 1	Extracció 2
P A-20	1.18	2.06
	1.46	3.57
4433	3.26	5.32
	0.82	6.71
4434	2.30	5.74
	1.08	7.35
4435	7.88	6.68
	8.14	8.91
4470	22.70	5.62
	23.72	7.09
4471	0.92	5.72
	4.30	6.13
5054	<LOQ	3.06
	<LOQ	3.39
5314	2.38	3.52
	2.58	5.53

A simple vista s'observen diferències significatives entre les diverses extraccions, aquest fet podria ser degut a un error en la mesura de les extraccions ja que la majoria de mostres de la mateixa extracció si que tenen una repetibilitat entre elles.

Degut a que no hi ha repetibilitat entre les extraccions, estadísticament no es correcte realitzar el càlcul de la repetibilitat i de la incertesa.

6.2 Mètode del EDTA

Es va realitzar la comparació entre rectes com en el cas del mètode del NH_4OAc , els resultats obtinguts són els de la taula 11.

Taula 11. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del EDTA en diferents rectes de calibratge

Terres	Recta en EDTA	Recta en H_2O
P A-20	0.92	1.00
	1.47	1.20
4433	14.05	15.66
	15.57	16.14
4434	13.05	12.66
	14.47	12.91
4435	15.65	19.26
	16.57	19.11
4470	16.80	18.81
	17.22	18.36
4471	16.10	14.86
	17.87	15.29
5054	0.42	0.68
	0.56	0.86
5314	13.40	13.91
	14.72	14.74

S'estudien les mostres mitjançant un test t de Student, el valor de la t calculada s'obté mitjançant l'equació 2, i es va obtenir un valor de 0.4045. Mentre que la t tabulada per a aquest cas és 1.895. Al ser el valor de la t calculada menor que el de la t tabulada no hi ha diferències significatives entre mètodes, per tant s'obtindrien els mateixos valors treballant en la recta realitzada amb EDTA o amb H_2O . Per factor econòmic es decideix treballar en la recta de H_2O .

A continuació, com en el mètode anterior, s'estudien les mostres de terres adicionades els valors obtinguts són els representats en la taula 12.

Taula 12. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres adicionades extretes en el mètode del EDTA

Terra	Extracció 1	Extracció 2	Extracció 3
P A -20	1.43	1.64	1.51
	1.44	2.16	1.59
0 Cu 1	10.74	9.87	9.54
	10.83	10.12	9.89
0 Cu 2	10.25	11.59	9.53
	10.89	11.78	9.96
4 Cu 1	37.52	40.11	36.98
	39.17	41.36	40.89
4 Cu 2	39.79	47.71	40.11
	37.52	48.24	41.94
8 Cu 1	81.93	95.37	79.72
	81.83	96.53	84.63
8 Cu 2	76.18	94.47	77.72
	75.53	91.88	81.39
13 Cu 1	107.28	103.57	108.12
	105.73	106.93	111.74
13 Cu 2	110.78	119.82	102.72
	103.98	120.63	106.14
25 Cu 1	141.27	144.34	139.23
	134.07	150.49	146.61
25 Cu 2	158.07	175.61	166.53
	155.00	179.52	174.21

Es va realitzar un test ANOVA de un factor i d'aquest test es van obtenir els resultats de la taula 13.

Taula 13. Test ANOVA per a les mostres adicionades extretes en el mètode del EDTA

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	717.41	2	358.71	0.1179	0.8890	3.1428
Dins dels grups	$1.92 \cdot 10^5$	63	3042.2			
Total	$1.92 \cdot 10^5$	65				

Com ha passat en el mètode del NH_4OAc , el valor de la F calculada per a les extraccions és 0.1179 mentre que el valor de la F tabulada és 3.1428. Per tant, al ser el valor de la F calculada menor que el de la F tabulada no hi han diferències significatives entre extraccions.

En els valors obtinguts es va procedir a realitzar un estudi de la recuperació del mètode mitjançant l'equació 3. Els resultats obtinguts estan representats en la taula 14.

Taula 14. Estudi de la recuperació de les mostres adicionades per el mètode del EDTA

Terra	Mitjana concentracions (mg/kg)	Afegit (mg/kg)	Recuperació (%)
0 Cu	10.42	0.00	
4 Cu	40.96	24.00	127.18
8 Cu	84.77	48.02	154.83
13 Cu	108.95	78.06	126.23
25 Cu	155.41	150.00	96.66

S'obtenen uns percentatges homogenis, no com en el cas del mètode del NH_4OAc . Els percentatges de recuperació superen el 100%, en concentracions petites aquest fet pot tindre lloc. S'observa que el valor de recuperació de la terra 8 Cu és del 154.83%, es pot pensar en que en el anàlisi va poder aparèixer alguna interferència.

Un cop realitzat el test ANOVA i el càlcul de les recuperacions es va procedir a realitzar dues extraccions diferents i a determinar la quantitat de coure per el mètode del EDTA de les mostres de terres, els resultats de les mostres es veuen reflectits en la taula 15.

Taula 15. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del EDTA

Terres	Extracció 1	Extracció 2
P A-20	1.00	0.92
	1.20	1.47
4433	15.66	14.05
	16.14	15.57
4434	12.66	13.05
	12.91	14.47
4435	19.26	15.65
	19.11	16.57
4470	18.81	16.80
	18.36	20.22
4471	14.86	16.10
	15.29	17.87
5054	0.68	0.42
	0.86	0.56
5314	13.91	13.40
	14.74	14.72

Com es va suposar en les terres franques la concentració de Cu d'intercanvi és menor a la del Cu disponible i en la mostra franca argilosa és a la inversa.

Es va realitzar un test ANOVA de un factor per estudiar la repetibilitat de les extraccions, els resultats obtinguts són els representats a la taula 16.

Taula 16. Test ANOVA per a les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del EDTA

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	0.40	1	0.40	0.0083	0.9281	4.1709
Dins dels grups	1449.27	30	48.31			
Total	1449.67	31				

En aquest cas el valor de la F calculada per a les extraccions és 0.0083 mentre que el valor de la F tabulada és 4.1709, per tant, al ser el valor de la F calculada menor que el de la F tabulada no hi han diferències significatives entre cada tipus de terra. Al no haver-hi diferències significatives entre les extraccions es pot realitzar el càlcul de la repetibilitat com s'ha comentat en el punt 5.11.5. Els valors obtinguts són els representats en la taula 17.

Taula 17. Repetibilitat de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del EDTA

Terres	Repetibilitat (r)
P A-20	0.35
T 4433	0.66
T 4434	0.63
T 4435	1.01
T 4470	0.80
T 4471	0.80
T 5054	0.31
T 5314	0.60

Es va realitzar també el càlcul de la incertesa del mètode per a les mostres de les DO Catalunya mitjançant el procediment descrit en l'apartat 5.11.6. A la taula 18 estan representats els valors de la incertesa amb els valors de la concentració. Per al càlcul es va prendre un valor de recuperació del 100% degut a que la mitjana es va obtenir un valor superior al 100% de recuperació.

Taula 18. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del EDTA amb incertesa

Terres	Concentracions amb incertesa
P A-20	1.15±0.16
T 4433	15.36±0.16
T 4434	13.27±0.15
T 4435	17.65±0.17
T 4470	18.55±0.18
T 4471	16.03±0.16
T 5054	0.63±0.11
T 5314	14.19±0.15

S'ha obtingut un incertesa inferior al 10%, per tant s'accepta aquest extracció.

6.3 Mètode de Mehlich-1

Per al mètode del Mehlich-1 es va determinar les concentracions de coure de les mostres, els resultats que es van obtenir eren inferiors al límit de quantificació (LOQ).

S'obtenen concentracions inferiors al LOQ tant del blanc, de totes les mostres i del patró. Es pensa que en el temps d'agitació de la mostra, que són 10 minuts segons el procediment bibliogràfic, no es té suficientment temps per a que la solució extregui el coure. S'incrementa el temps d'extracció a 30 minuts però tots els resultats obtinguts són inferiors al LOQ.

Es pensa en variar uns altres punts del procediment, com s'ha comentat en el punt 5.5.3, i el primer consisteix en no enrasar la solució final fins al volum de 100 ml. Tots els valors obtinguts van ser inferiors al LOQ.

La tercera variació en el procediment va consistir en variar la forma de enrasament de la solució final, es va realitzar l'enrasament mitjançant la pròpia solució de Mehlich-1, però com en els anteriors casos els valors obtinguts van resultar inferiors al LOQ.

Després de totes les variacions al mètode es va rebutjar el mètode del Mehlich-1 ja que sempre s'obtenien uns valors de concentració negatius. Es va concloure que aquest fet pot ser degut a que no té suficient poder extractor per al coure.

6.4 Mètode de Mehlich-3

Com en els anteriors mètodes es va realitzar un estudi de comparació per a comprovar l'existència de diferències significatives entre la realització de la recta de calibratge en H₂O i en la pròpia solució de Mehlich-3. Els resultats obtinguts s'observen en la taula 19.

Taula 19. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del Mehlich-3 en diferents rectes de calibratge

Terres	Recta en Mehlich-3	Recta en H ₂ O
P A-20	<LOQ	1.52
	2.28	1.78
4433	13.33	14.07
	15.85	14.86
4434	11.71	12.29
	14.02	13.23
4435	19.80	19.73
	22.32	20.95
4470	14.57	15.02
	16.68	16.46
4471	13.04	13.54
	15.24	15.12
5054	<LOQ	1.40
	1.80	1.57
5314	18.32	19.50
	20.77	20.02

A primera vista no pareix que hi hagin diferències significatives, es va realitzar un test t de Student per a comparar els procediments de les rectes de calibratge. El valor de la t calculada, mitjançant l'equació 2, és 0.1251 mentre que la t tabulada és 1.895. Com en el cas del EDTA no hi ha diferències significatives entre les dues rectes, però es treballarà en la recta de H₂O per motius econòmics.

Posteriorment es van determinar les mostres de terres adicionades, els resultats són els representats en la taula 20:

Taula 20. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres addicionades extretes en el mètode del Mehlich-3

Terres	Extracció 1	Extracció 2	Extracció 3
P A-20	1.77	0.37	0.55
	1.20	0.72	0.57
0 Cu 1	10.72	10.16	7.38
	10.53	10.64	7.41
0 Cu 2	12.25	6.58	7.73
	12.03	6.80	7.71
4 Cu 1	48.27	36.69	35.21
	46.83	39.26	36.38
4 Cu 2	41.51	38.05	38.61
	40.03	40.98	38.62
8 Cu 1	133.26	129.37	132.74
	123.10	132.04	130.69
8 Cu 2	134.62	133.45	136.74
	127.74	105.52	134.37
13 Cu 1	108.78	105.52	104.12
	102.38	107.66	100.76
13 Cu 2	115.98	92.92	95.42
	106.98	98.35	97.26
25 Cu 1	151.92	146.87	131.43
	143.67	154.27	132.09
25 Cu 2	179.38	143.15	172.38
	169.17	153.22	174.84

Es va realitzar un test ANOVA de un factor i d'aquest test es van obtenir els resultats de la taula 21.

Taula 21. Test ANOVA per a les mostres addicionades extretes en el mètode de Mehlich-3

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	419.99	2	208.49	0.0589	0.9428	3.1428
Dins dels grups	$2.23 \cdot 10^5$	63	3538.98			
Total	$2.23 \cdot 10^5$	65				

Com en els mètodes del NH_4OAc i de l'EDTA el valor de la F calculada per a les extraccions és 0.0589 mentre que el valor de la F tabulada és 3.1428, per tant al ser el valor de la F calculada menor que el de la F tabulada no hi han diferències significatives entre extraccions.

En els valors obtinguts es va procedir a realitzar un estudi de la recuperació del mètode mitjançant la equació 3. Els resultats obtinguts estan representats en la taula 22.

Taula 22. Estudi de la recuperació de les mostres adicionades per el mètode del Mehlich-3

Terra	Mitjana concentracions (mg/kg)	Afegit (mg/kg)	Recuperació (%)
0 Cu	9.17	0.00	
4 Cu	40.04	24.00	128.60
8 Cu	129.47	48.02	250.53
13 Cu	103.01	78.06	120.21
25 Cu	154.36	150.00	96.80

S'obtenen uns percentatges homogenis, com en el mètode de l'ETDA, hi han percentatges de recuperació que superen al 100%, com s'ha comentat en el cas de l'EDTA aquest fet pot tenir lloc. S'observa que el valor de recuperació de la terra 8 Cu és del 250.53%, degut a que en el mètode de l'EDTA també és en aquest punt es pot pensar en que la interferència la tingui la mostra.

Un cop realitzat el test ANOVA i el càlcul de les recuperacions és va procedir a realitzar dues extraccions diferents i a determinar la quantitat de coure per el mètode de l'EDTA de les mostres de terres, els resultats de les mostres es veuen reflectits en la taula 23.

Taula 23. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode de Mehlich-3

Terres	Extracció 1	Extracció 2
P A-20	1.47	1.52
	3.57	1.78
4433	16.74	14.07
	17.59	14.86
4434	14.36	12.29
	14.88	13.23
4435	20.83	19.73
	20.96	20.95
4470	15.84	15.02
	16.19	16.46
4471	15.82	13.54
	16.03	15.12
5054	1.02	1.40
	0.45	1.57
5314	20.75	19.50
	21.14	20.02

Es va realitzar un test ANOVA per estudiar la repetibilitat entre extraccions, ja que a simple vista no es veuen diferències significatives. El resultat d'aquest test es pot observar en la taula 24.

Taula 24. Test ANOVA per a les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode de Mehlich-3

<i>Origen de les variacions</i>	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Graus de llibertat</i>	<i>Mitjana dels quadrats</i>	<i>F calculat</i>	<i>Probabilitat</i>	<i>F tabulat</i>
Entre grups	8.55	1	8.55	0.1613	0.6908	4.1709
Dins dels grups	1589.77	30	52.99			
Total	1598.32	31				

El valor de la F calculada per a les extraccions és 0.1613 mentre que el valor de la F tabulada és 4.1709. Per tant, al ser el valor de la F calculada menor que el de la F tabulada no hi han diferències significatives entre extraccions, com en el cas de l'EDTA.

Com no hi ha diferències significatives entre les extraccions es procedeix a realitzar el càlcul de la repetibilitat mitjançant l'equació 4, els resultats obtinguts es poden observar en la taula 25.

Taula 25. Repetibilitat de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del Mehlich-3

Terres	Repetibilitat (r)
P A-20	0.70
T 4433	0.95
T 4434	0.79
T 4435	0.54
T 4470	0.55
T 4471	0.73
T 5054	0.50
T 5314	0.63

S'obté una bona repetibilitat i aquesta s'observa que és més homogènia que en el cas de l'EDTA.

Es realitza el càlcul de la incertesa, mitjançant l'equació 5, com en el cas de l'EDTA la mitjana dels percentatges de recuperació es major al 100% però per al càlcul de la incertesa es suposa una recuperació del 100%. Els valors obtinguts de incertesa es troben representats en la taula 26.

Taula 26. Resultats en mg Cu/kg de matèria seca de les mostres de les DO Catalunya extretes en el mètode del Mehlich-3 amb incertesa

Terres	Concentracions amb incertesa
P A-20	2.09±0.04
T 4433	15.82±0.35
T 4434	13.69±0.30
T 4435	20.62±0.47
T 4470	15.88±0.35
T 4471	15.13±0.34
T 5054	1.11±0.05
T 5314	20.35±0.46

6.5 Discussió de resultats entre mètodes

Com s'ha comentat l'únic mètode que pateix efecte matriu és el del NH₄OAc.

En el mètode del NH₄OAc es van obtenir uns valors més baixos i amb poca repetibilitat en les mostres de les DO Catalunya comparat en els mètodes del EDTA i del Mehlich-3. Tal com s'ha vist en els apartats anteriors les concentracions de coure de les mostres de les DO Catalunya són baixes. En el cas del mètode del NH₄OAc és la fracció més baixa (coure d'intercanvi).

És possible que aquest fet produeixi més problemes en l'extracció i en la lectura del aparell per llindars de sensibilitat. La senyal pot estar afectada per el propi soroll de fons de l'aparell al ser tan baixa.

Per tractar de millorar els resultats del mètode del NH₄OAc es podrien fer noves extraccions per descartar que no hagués patit un possible error en el procés i realitzar un nou test estadístic. Aquesta proposta de millora no es va poder realitzar per falta de temps.

Respecte als resultats dels mètodes del EDTA i del Mehlich-3, tant per les mostres addicionades com per les mostres de les DO de Catalunya, es van obtenir unes bones repetibilitats entre extraccions i unes incerteses menors del 10%. Per tant es pot afirmar que són uns mètodes vàlids per a la determinació del coure corresponent.

7. Conclusions

- Four methods were used for the determination of copper in vineyard soils. NH_4OAc , EDTA, Mehlich-1 and Mehlich-3 and differ from each other in the type of copper they extract and in the extraction process.
- Mehlich-1 method was discarded due to a low extraction power.
- From all methods matrix effect was detected in the AAS measurements in the NH_4OAc method.
- In spiked samples good repeatability was obtained between the extractions for the different methods (NH_4OAc , EDTA, Mehlich-3). This may be due to the low homogeneity of the solid samples.
- Regarding the recoveries, dispersion was obtained in the results of the NH_4OAc method. This fact may be because the copper determined was the exchange copper which was in low quantity in the soils. When working in low concentrations there may be more dispersion.
- Regarding the recoveries of the EDTA and Mehlich-3 methods, sample 8 Cu may to have an interference due to the highest recovery, the other samples recovery obtained was between 96-128%.
- For the soil samples of the DO Catalunya for the NH_4OAc method, low repeatability was obtained due to the low homogeneity of the sample. However, for the EDTA and Mehlich-3 methods a good repeatability and an uncertainty of less than 10% were obtained in practically all the samples.

8. Bibliografia

- (1) Generalitat de Catalunya. institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI). <http://incavi.gencat.cat/ca/> (data de consulta 1 abril 2017)
- (2) Greenwood, P. *Enciclopedia de las plagas y enfermedades de las plantas*; Blume: Barcelona, 2002.
- (3) Perez, Augusto; López, J. *Geomorfología y territorio; Servizio de Pubblicacion e Intercambio Cientifico*, 1st ed.; Universidad de Santiago de Compostela :Santiago de Compostela, 2006
- (4) Tan, K. H. ; *Soil Sampling, Preparation, And Analysis*; 2nd ed, Taylor & Francis Group: Boca Raton, Fl; 2005;
- (5) Procediment del centre de l'INCAVI. *Extracció en acetat d'amoní realitzada al INCAVI*.
- (6) Gómez-Armesto, A.; Carballeira-Díaz, J.; Pérez-Rodríguez, P.; Fernandez-Calviño, D.; Arias-Estévez, M.; Nóvoa-Muñoz, J. C.; Álvarez-Rodríguez, E.; Fernández-Sanjurjo, M. J.; Núñez-Delgado, Copper content and distribution in vineyard soils from Betanzos (A Coruña, Spain), A. *Spanish J. Soil Sci.* **2015**, 5 (1), 60–71.
- (7) Ramos, M. C. Metals in vineyard soils of the Penedès area (NE Spain) after compost application. *J. Environ. Manage.* **2006**, 78 (3), 209–215
- (8) ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- (9) D.L. Massart, B.M.G. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part Elsevier(1997), Amsterdam
- (10) Guzman, Z. Aplicación Metrológica de los Estudios r&R (Repetibilidad y Reproducibilidad). *Metas Metrólogos Asoc.* **2003**, 4.