

TEMA 18. ANÁLISIS DE PLANTAS

1. Introducción.
2. Muestreo, transporte y conservación del material vegetal
3. Preparación de la muestra
4. Parámetros de Análisis
5. Métodos de Análisis Químico
6. Valoración de los Resultados
7. Bibliografía

1. Introducción

El Análisis Foliar, de Tejidos Vegetales o Análisis de Plantas, consiste en la determinación de la composición química de alguna parte determinada de la planta. Actualmente se considera como una referencia indispensable para determinar tanto los requerimientos nutricionales de plantaciones como los estados carenciales de microelementos. Ello se debe a que el análisis foliar da una indicación precisa de la absorción de los diferentes elementos por la planta, ya que las hojas son muy sensibles a los cambios de composición del medio nutritivo.

El análisis de la planta como técnica de diagnóstico, tiene una historia considerable de aplicación. Recientemente, se ha utilizado para determinar el estatus nutritivo del suelo y las plantas, como base para determinar las necesidades de cal, fertilizantes, etc. Entre los diversos objetivos que se han propuesto para analizar las plantas, el más frecuente es la verificación de síntomas de deficiencias o estatus nutritivo. Así mismo, es una herramienta muy útil para determinar absorción de sustancias tóxicas por las plantas, residuos de plaguicidas, y las posibles consecuencias derivadas de procesos de contaminación atmosférica, de las aguas o de los suelos. Entre otras aplicaciones del análisis de plantas, podemos destacar:

- Determinar el estado Nutricional de las Plantas.
- Elaborar un Diagnóstico Nutricional.
- Complementar el Análisis del Suelo.
- Estudios de Contaminación Ambiental.
- Estudios de Geobotánica.
- Toxicología Ambiental.
- En taxonomía vegetal, permite la identificación química de especies y quimiotipos.

2. Muestreo, transporte y conservación del material vegetal.

Muestreo: El objetivo de los procedimientos de muestreo es obtener una muestra representativa del total, para realizar el análisis y determinar los niveles de los diversos componentes de la materia vegetal, como minerales, macro y micronutrientes, o residuos de plaguicidas remanentes en los vegetales.

La correcta utilización de esta práctica requiere efectuar adecuadamente la toma de muestras, de modo que sea representativa del conjunto, e interpretar correctamente los análisis. El contenido en nutrientes de las hojas depende de factores como la edad, tipo y posición de la hoja que se muestrea, la disponibilidad de nutrientes del suelo, el estado fitosanitario, etc.

La variabilidad de la muestra en campo hace que las consideraciones previas respecto al muestreo sean similares a aquellas descritas en capítulos anteriores respecto a exactitud, precisión y número de muestras.

Así mismo han de registrarse algunos datos como densidad de vegetación, altura, morfología, especies asociadas, naturaleza del suelo, aspecto, drenaje y topografía local. También varía mucho el contenido inorgánico en las distintas partes de la planta. Para la mayoría de las plantas, los órganos más ricos en estas sustancias son los ápices, las hojas y los tallos si son fotosintéticos. Los tejidos leñosos generalmente acumulan menos elementos. Así mismo, el contenido en nutrientes es mayor en los tejidos jóvenes. También se debe tener en cuenta la fluctuación en el contenido en nutrientes que ocurre diaria, estacional, o anualmente.

Para el muestreo se emplean los equipos usados normalmente en los trabajos forestales y agrícolas. Como norma general, no deben recogerse las plantas con el tiempo húmedo. Los instrumentos que se utilizan para la toma de muestras deben estar libres de contaminantes de plaguicidas. Se deben utilizar envases nuevos y en perfecto estado de limpieza. Las muestras deben de transportarse refrigeradas y mantenerse así hasta que se realice el análisis.

Métodos de muestreo: a) **Método aleatorio** que consiste en darle a cada uno de los elementos de la población una probabilidad conocida de ser incluido en la muestra. Para este método, se utiliza la tabla de números aleatorios. b) **Método en X**, que Consiste en dibujar una X imaginaria en el área a muestrear y recolectar la muestra desde los extremos hasta el centro de la X hasta completar la cantidad necesaria. c) **Método en ZIG-ZAG** que consiste en dibujar un ZIG-ZAG imaginario en el área a muestrear y recolectar la muestra hasta completar la cantidad necesaria.

Transporte y conservación.: para el transporte y almacén, la muestra se mantendrá en las condiciones más parecidas a las de campo. Pueden ser refrigeradas, conservadas en bolsas de papel o de plástico, pero en éstas el tiempo de permanencia ha de ser el mínimo posible, ya que las reacciones enzimáticas pueden llevar a cambios en la estructura química.

Limpieza y descontaminación: la descontaminación es necesaria para eliminar sustancias no nativas si se determina que el tejido foliar está cubierto de polvo o de materiales de fumigación. Existen muchas fuentes de contaminación en el campo que incluyen:

- Arrastre de fertilizantes por el viento.
- Excrementos de animales (dan lugar a contenidos muy elevados en N y P)
- Contaminación de metales por estructuras cercanas, tipo vallado, cables, etc.
- Herramientas y contenedores metálicos oxidados.

Se deben enjuagar las muestras suavemente para quitar las partículas de la superficie de las hojas. No deben lavarse demasiado, pues algunos nutrientes solubles podrían perderse. Las muestras han de secarse suavemente con un trapo o papel.

3.- Preparación de la muestra para el análisis químico

Secado y Conservación: El secado y la reducción de tamaño de muestra (molienda) preparan la muestra para el análisis del laboratorio. El material tiene que estar perfectamente seco antes de guardarlo en un recipiente hermético y opaco o en bolsas de papel, vigilando el desarrollo hongos. Las bolsas se etiquetan con nombre de la planta, fecha y lugar de recolección. Se guardan en lugar fresco y ventilado, a la sombra, protegido de la luz.

Determinación de humedad: se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. Para una buena conservación, el contenido ha de ser inferior al 10%. En el material vegetal seleccionado (planta entera, hojas, raíz, etc.) se determina la humedad siguiendo el método elegido. Existen dos métodos principalmente:

El método gravimétrico, o pérdida de peso en estufa a 105 °C hasta peso constante. Este es un método orientativo, ya que en la calefacción pueden perderse compuestos volátiles distintos del agua.

$$\text{Humedad (\%)} = [\text{peso perdido (g)}/\text{peso inicial (g)}] \cdot 100$$

El método volumétrico, por arrastre del agua con un disolvente no miscible, como xileno o tolueno (figura 18.1).

Contenido en cenizas: el término cenizas totales se refiere a el residuo que deja la combustión de la muestra y es una medida de el contenido mineral total. Se obtienen por calcinación en mufla a 400° C durante 24h. Una vez enfriado se pesa. Además, en las cenizas obtenidas se evaluará el contenido en elementos minerales disolviéndolas en HCl (1:1).

$$\text{Cenizas (\%)} = [\text{peso cenizas (g)}/\text{peso seco (g)}] \cdot 100$$

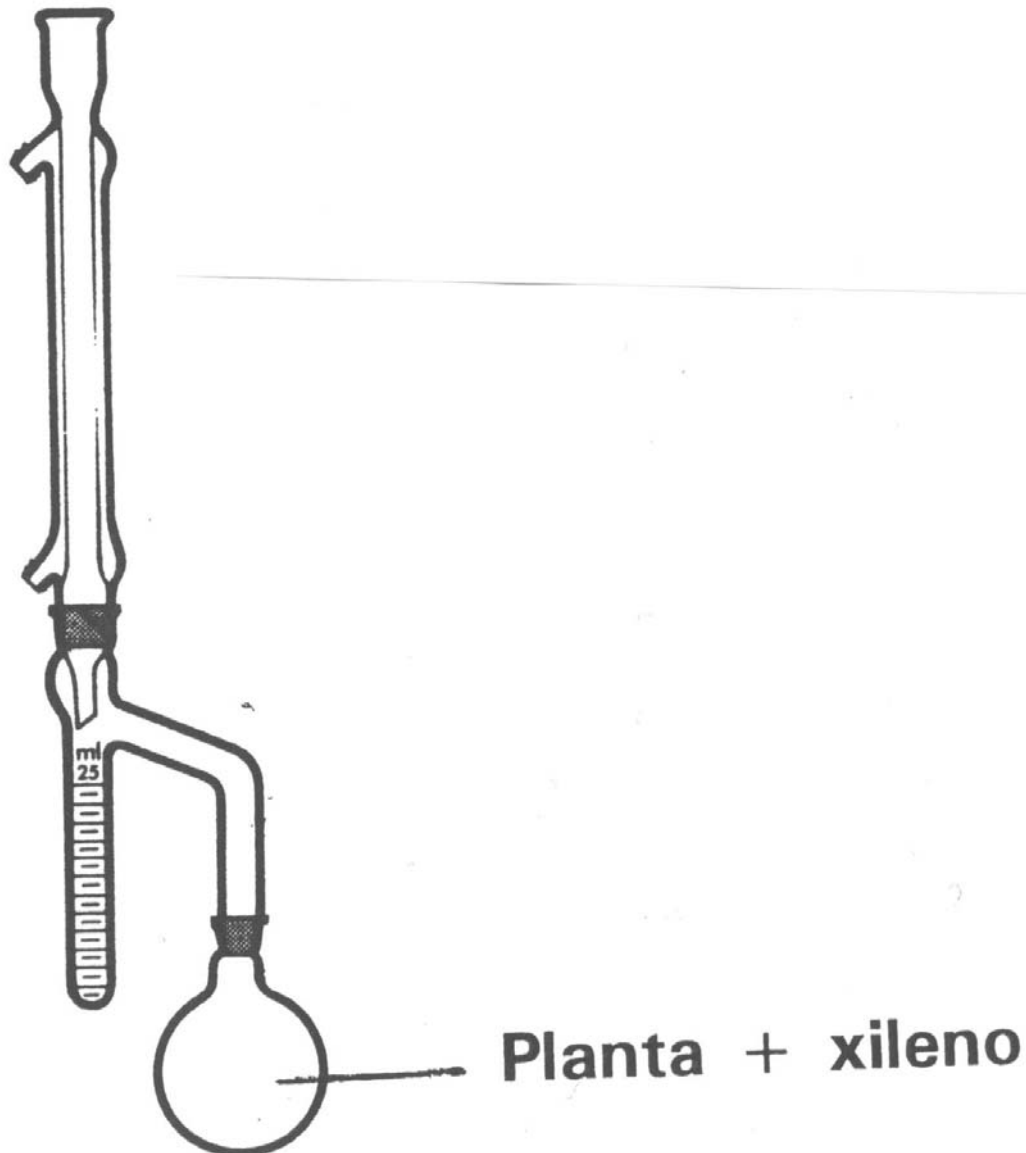


Figura 18.1 Determinación de humedad en plantas

Preparación de la disolución: para el análisis de elementos es útil la preparación de una disolución. Para ello es necesario destruir la materia orgánica mediante un proceso de oxidación previa al análisis, que consiste en la disolución de las cenizas en ácido (HCl) o su digestión ácida (Kjeldhal). También se puede realizar una digestión de la muestra en horno microondas.

4. Parámetros de Análisis

Los parámetros de análisis suelen ser aquellos de interés en cuanto a requerimientos nutricionales de las plantas, como son los macro y micronutrientes, y sustancias contaminantes como residuos de fumigación, pesticidas o metales.

- Macronutrientes: Na, K, Mg, Ca, P, N
- Micronutrientes: Zn, Cu, Fe, Mn, B, Al.
- Extractos (fracción no volátil): flavonoides, ácidos fenólicos.
- Esencias (fracción volátil)
- Contaminantes: metales, pesticidas.

5.- Métodos de Análisis Químico

En la Tabla 18.1 se muestra un resumen de los métodos analíticos aplicados al análisis de material vegetal.

Tabla 18.1 Métodos analíticos para materia vegetal	
PARÁMETRO	MÉTODOS
Humedad	Gravimetría o volumetría
Cenizas totales	Combustión, calcinación
Preparación de la disolución	Digestión ácida o disolución cenizas en HCl(1:1)
Nitrógeno Total (N)	Digestión Kjeldhal + Espectrofotometría UV - Vis
Azufre (S)	Digestión ácida + Espectrofotometría UV - Vis
Boro (B), Fósforo (P)	Espectrofotometría UV - Vis
Molibdeno (Mo)	Absorción Atómica con Cámara de Grafito
Potasio (K), Sodio (Na)	Espectrofotometría de Emisión de Llama
Hg y Selenio	Espectrofotometría de Absorción Atómica Vapor Frío
Cu, Zn, Fe, Mn	Espectrofotometría de Absorción Atómica
Cl ⁻ , NO ₃	Electrodos específicos o Cromatografía Iónica
Aceites esenciales	Destilación + CGL
Extractos (Flavonoides)	Extracción + HPLC
Extractos (Ácidos fenólicos)	Extracción + HPLC

Análisis de elementos; Tras la combustión o digestión ácida, se analiza cada uno de los micro o macronutrientes u otros elementos de interés. La calibración se lleva a cabo mediante patrones a partir de disoluciones estándar. Se determinan macronutrientes (Na, K, Ca, Mg y Mn) y micronutrientes (Fe, Cu, Zn) analizándolos por Espectrofotometría de Absorción Atómica. De esta forma, se conoce la cantidad de cada uno de ellos que la planta extrae del suelo en cada uno de sus estados fenológicos.

En la figura 18.2, se muestra un ejemplo de lo que sería un esquema de análisis foliar para elementos, desde la preparación de la muestra hasta su análisis.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLANTAS Y ANÁLISIS FOLIAR

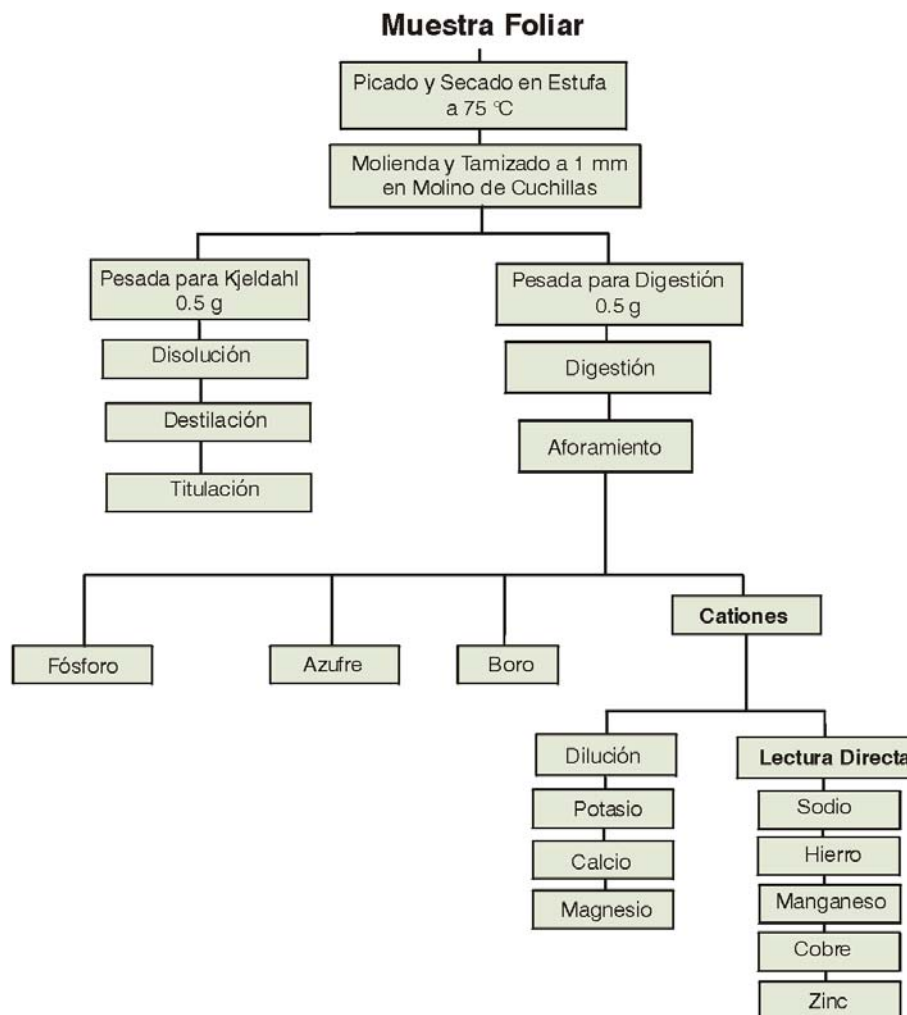
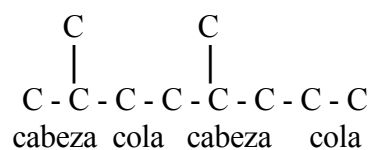


Figura 18.2 Análisis de elementos en plantas

Componentes volátiles (Aceites esenciales): Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de estudio en plantas aromáticas y medicinales, compuesta por terpenos y derivados, derivados del benceno y otros. Se determinan por cromatografía de gases (CGL) y espectrometría de masas si es necesario, tras su obtención por destilación de arrastre de vapor a presión atmosférica.

Los aceites esenciales están formados en su mayoría por terpenos, fenilpropanos y compuestos alifáticos de bajo peso molecular. La característica fundamental de los terpenos es que están constituidos por unidades de isopreno (2 metil butadieno). Tienen un número de átomos de carbono múltiplo de 5. Los terpenos presentes en los aceites esenciales son monoterpenos (C_{10} , 2 unidades de isopreno) y sesquiterpenos (C_{15} , 3 unidades de isopreno). En la mayoría de los terpenos la unión de las unidades de isopreno es, en general, de tipo cabeza-cola 1-4: el carbono 1 de una molécula está unido al carbono 4 de otra: esto constituye la denominada **regla isoprénica**.



La obtención se realiza por hidrodestilación en Clavenger (figura 18.3), método recomendado en la Farmacopea para muestras pequeñas, inferiores a 20 g o bien por arrastre de vapor (figura 18.4).

Los aceites esenciales obtenidos se deshidratan con Na_2SO_4 y en ellos se determinan las características organolépticas (color, olor y sabor) y su composición química.

La identificación de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales se realiza por Cromatografía de Gases (CGL), por comparación de los tiempos de retención de los picos eluidos con los de patrones puros y con datos bibliográficos, y, si es necesario, se recurre a la identificación por Espectrofotometría de Masas. En la Tabla 18.2 se muestra a modo de ejemplo los componentes encontrados en el aceite esencial del orégano verde cultivado en la provincia de Guadalajara, el rango de valores hallados en las distintas submuestras y el valor medio para cada uno de ellos. El contenido se expresa en %.

Tabla 18. 2. Componentes mayoritarios encontrados en *Origanum vulgare* L. ssp *viride* (%)

	Rango	Valor medio		Rango	Valor medio
β pineno	t – 0,8	0,5	linalol	0,1 – 14,2	5,3
p cimeno	t – 7,0	1,9	limoneno	t – 0,8	0,2
α felandreno	1,2 – 36,9	9,9	borneol	t – 2,2	0,5
1-8 cineol	2,7 – 25,5	16,8	terpinen-4-ol	0,6 – 2,9	1,6
γ terpineno	t – 7,8	3,0	acetato bornilo	2,7 – 14,0	7,3
Carvacrol	0,3 – 31,8	10,4	β cariofileno	1,0 – 2,3	1,4

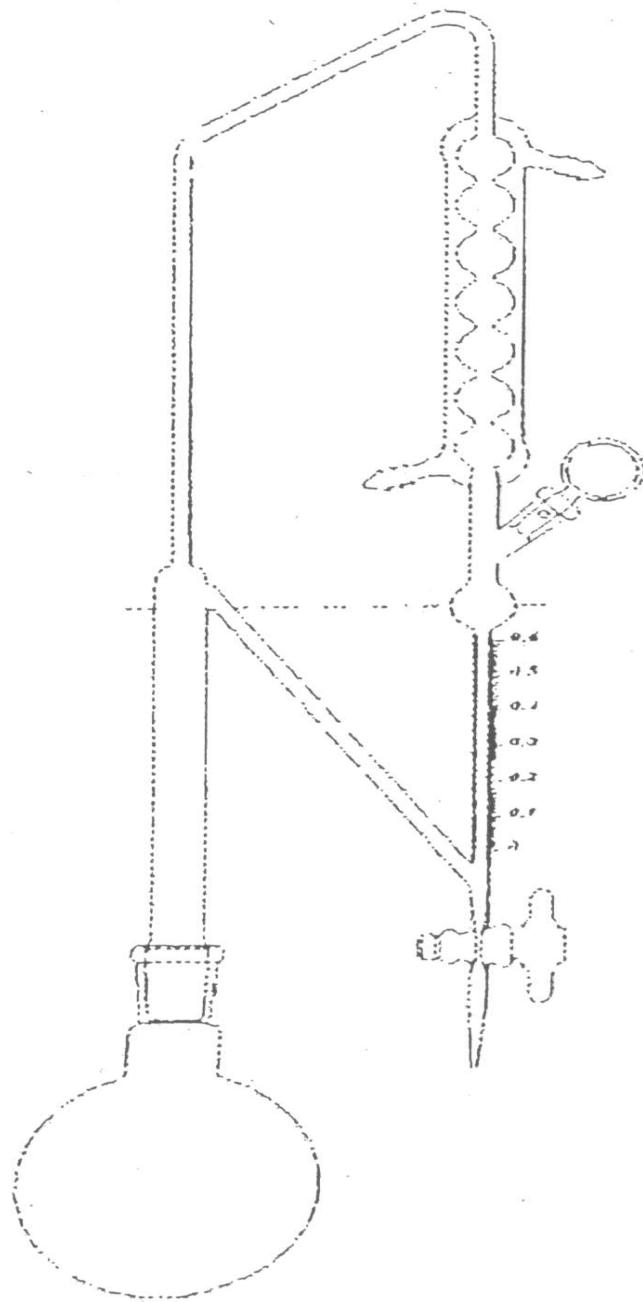


Figura 18.3 Aparato Clevenger

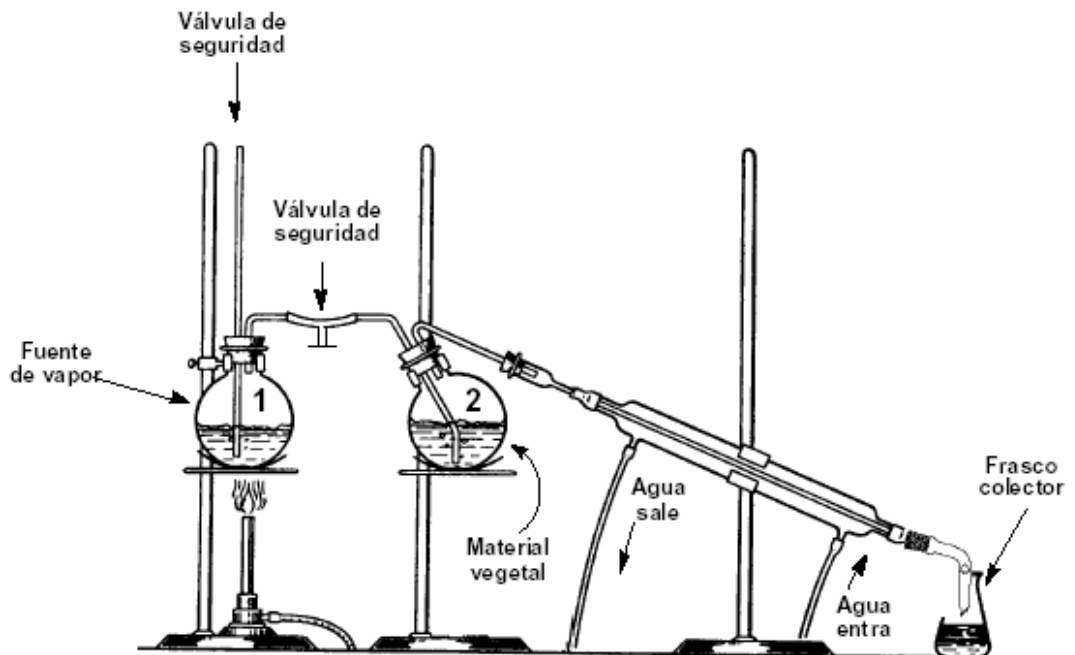


Figura 18.4 Destilación por arrastre de vapor (laboratorio)

Para muestras inferiores a 5 Kg, se realizará por arrastre de vapor de agua en caldera de acero inoxidable a presión atmosférica, y para muestras de más de 5 Kg, por arrastre de vapor de agua y con presión (figura 18.5).

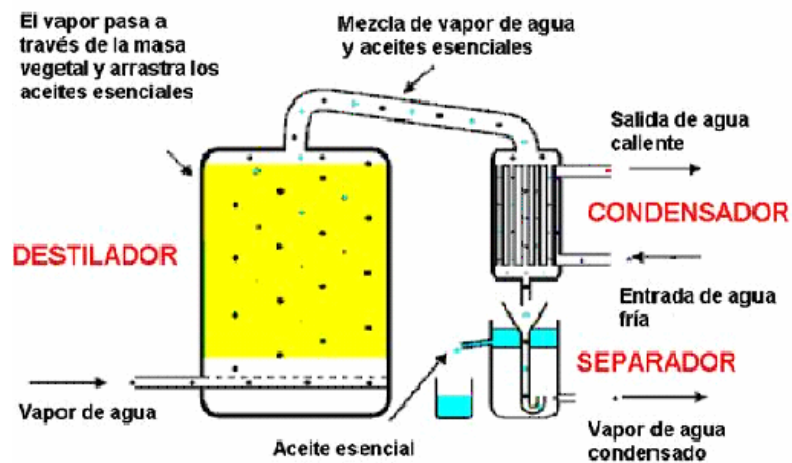


Figura 18.5 Arrastre de vapor en caldera (nivel industrial)

Componentes no volátiles (Extractos): Para la determinación de compuestos no volátiles se lleva a cabo una extracción sólido - líquido con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser capaz de disolver rápidamente todos los principios activos.
- Disolver la menor cantidad de materia inerte.
- Tener un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación.
- Químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes a analizar.
- No inflamable y barato.

Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, benceno y alcohol. Los componentes mayoritarios de los extractos son:

- Ácidos Fenólicos: Gálico, 2,4,6 TOHB, protocatéquico, gentísico, clorogénico, vainílico, rutósido, isovainílico, OHcinámico, siríngico, sinápico, ferúlico, 4 metoxifenilacético.
- Flavonoides: rutósido, naringina, luteolina, quercetina, apigenina, crysoeriol.

Cada grupo se extrae y analiza por separado pero en ambos casos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) utilizando detector UV/VIS a λ 280 nm (ácidos fenólicos) ó 254 nm (flavonoides). La identificación se lleva a cabo comparando sus tiempos de retención con los patrones puros, y con sus espectros UV cuando fuera necesario. Se identifican únicamente los componentes mayoritarios. La cuantificación se realiza por el método de patrón interno.

Ensayos de control de calidad y pureza: Estos ensayos están encaminados tanto a confirmar la identidad de materias primas vegetales como a valorar su calidad y pureza, con vistas a su normalización. La calidad y pureza requeridas para una sustancia o materia prima vegetal viene determinada por los patrones o estándares (valores numéricos) dados en las farmacopeas y normas de calidad. Cuando las materias primas no reúnen los requisitos deben ser rechazadas.

Para este tipo de control se emplean ensayos físico – químicos cuantitativos de tipo general (humedad, cenizas, residuos de productos fitosanitarios) o de tipo específico, útiles para cuantificar o valorar determinados principios activos relacionados con la actividad biológica que han sido aislados previamente (alcaloides, taninos, heterósidos). En la Tabla 18.3 se muestran los procedimientos analíticos a llevar a cabo para estos casos, según la Sociedad Española de Farmacología de la Industria.

Control botánico	Droga entera Droga pulverizada	Caracteres organolépticos	
		Caracteres microscópicos	
		Cortes histológicos	
		Estudio de elementos y contenidos celulares	
Ensayos físico-químicos cualitativos	Reacciones de identificación de principios activos	Alcaloides, Saponinas, Flavonoides, Taninos Heterósidos cianogénicos y antraquinónicos	
	Análisis cromatográfico	Cromatografía de adsorción Cromatografía de partición Cromatografía en capa fina o en papel Cromatografía de gases Cromatografía líquida de alta resolución Electroforesis	
Control de calidad y pureza de las drogas	Ensayos físico-químicos cuantitativos de tipo general	Humedad Residuos de productos fitosanitarios Contaminación microbiológica Contaminación radiactiva Naturaleza y tasa de elementos extraídos < 2% Cenizas	
		Metales pesados	Pb, Cd, Hg
		Aceites esenciales	Índice de hinchamiento Índice de refracción Poder rotatorio
Ensayos específicos según especie y finalidad del producto (extractos, esencia, etc.)			

6.- Valoración de resultados

La interpretación del análisis foliar se realiza comparando los resultados obtenidos con los valores estándar previamente establecidos para cada elemento.

Para la interpretación de los resultados de los análisis de tejidos vegetales se utilizará el criterio de suficiencia. Este criterio pretende que los valores foliares no sean inferiores a un nivel crítico, es decir, que se ubiquen dentro de un rango de suficiencia.

Análisis que detectan valores en los rangos desde bajo a suficiente pueden estar asociados a síntomas visibles de deficiencias o rendimientos reducidos. Por el contrario, análisis foliares en rango alto en exceso, se asocian a derroches en la utilización de fertilización y potenciales a bajos rendimientos.

Los niveles considerados como deficientes indican que el elemento en cuestión no alcanza en el tejido la concentración suficiente para el normal desarrollo de las funciones fisiológicas o procesos metabólicos en el que éste está implicado. Estas disfunciones producen sintomatologías características en diversos órganos (hojas, raíces, tallos) que, con limitaciones, permiten diagnosticar visualmente el estado carencial. La consecuencia final de todas estas alteraciones suele ser una disminución significativa del vigor de la planta.

Existen además una serie de procedimientos estandarizados para el control de calidad de muestras vegetales destinadas al consumo humano, como ocurre con las plantas aromática, medicinales y condimentarias. La finalidad del análisis químico de este tipo de materia vegetal es, entre otros, determinar:

- Rendimiento y composición química de la esencia y extractos obtenidos.
- Evolución del contenido en principios activos en el ciclo fenológico.
- Estandarización y garantía de calidad de los productos.
- Supervisión del cumplimiento de la normativa vigente al respecto.

7.- Bibliografía

- Allen, S. (1989). *Chemical Analysis of Ecological Materials*. Blackwell Scientific Publications. London.
- Kalra, Y.P. (Ed.) (1998). *Handbook of reference methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300p.
- Lachica, M., Aguilar, A. y Yáñez, J. 1973. Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental Zaidín. *Anales de Edafología y Agrobiología* 32, 1033-1047.