

ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS MINERALES ESENCIALES Y TÓXICOS EN TEJIDOS VEGETALES

ANALYSIS OF ESSENTIAL AND TOXIC MINERAL ELEMENTS IN PLANT TISSUE

Juliana **Padilla-Cuevas**^{1*}, Hernani T. **Yee-Madeira**², Agustín **Merino-García**³, Claudia **Hidalgo**¹, Jorge D. **Etchevers**¹

¹Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (jpadic@colpos.mx). ²ESFM. Instituto Politécnico Nacional. 07738, Ciudad México, México.

³Universidad Santiago de Compostela, Lugo, Galicia, España.

RESUMEN

Las técnicas para analizar los elementos esenciales o tóxicos para las plantas y los seres humanos, ha experimentado un acelerado desarrollo en los últimos tiempos, tanto en las convencionales o clásicas, que requieren la solubilización de la muestra, como en otras emergentes que no la requieren. Las técnicas convencionales avanzadas y las no destructivas se usan poco por los investigadores en genética, agronomía, nutrición, fisiología, biología, para evaluar la composición y calidad nutrimental de alimentos, cuantificar elementos metálicos esenciales y tóxicos, diagnosticar el estado nutrimental de los cultivos y estudiar alimentos funcionales. Estas técnicas analíticas se pueden aplicar, además, a suelos, abonos y fertilizantes. El objetivo de este ensayo es difundir las posibilidades de aplicación y los principios básicos de estas técnicas analíticas emergentes. La espectrometría de emisión por atomización con plasma inductivamente acoplado (ICP, Inductively coupled plasma) y la de ICP masas (ICP-MS, Mass spectrometry with inductive coupling plasma) tienen mayor interés que las técnicas clásicas usadas en los laboratorios de los países de escaso desarrollo, como las espectrometrías de emisión (AES, Atomic emission spectrometry) y absorción atómica (AAS, Atomic absorption spectrometry), que requieren solubilización de la matriz. La ICP-MS y la ICP tienen ventajas para el análisis simultáneo de contenidos totales de la mayoría de los elementos esenciales para el crecimiento de los vegetales. Entre las técnicas no destructivas de la matriz, la mayoría de las consideradas en este ensayo se basan en la interacción de los rayos X con la materia, como fotoemisión de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE, Particle induced X-ray emission), fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence) y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy),

ABSTRACT

Conventional and classic techniques to analyze the essential or toxic elements for plants and humans, either the ones requiring solubilization of the sample and others emerging ones that do not need it, have undergone an accelerated development in recent times. Researchers in genetics, agronomy, nutrition, physiology, and biology rarely used advanced conventional and non-destructive techniques to assess the nutrient composition and quality of food, quantify essential and toxic metallic elements, in order to diagnose the nutritional status of crops and to study functional foods. These analytical techniques are applied to soils, fertilizers and manures also. Atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP) and that of mass ICP (ICP-MS, Mass spectrometry with inductively coupled plasma) are of greater interest than the classical techniques used in laboratories in developing countries, such as emission spectrometry (AES, Atomic emission spectrometry) and atomic absorption spectrometry (AAS), which require matrix solubilization. The ICP-MS and the ICP allow the simultaneous analysis of the total contents of most of the essential elements for plant growth. Among the non-destructive techniques of the matrix, most of those considered in this essay are based on the interaction of X-rays with matter; such as X-ray photoemission (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), particle-induced X-ray emission (PIXE), X-ray fluorescence (XRF) and dispersion spectrometry of X-ray energy (EDS, Energy-dispersive X-ray spectrometry), similar in their principles. These techniques, unlike the previous ones, do not require the solubilization of the sample or its preparation is minimal. Other advantages are their speed, the performance of simultaneous multi-element analysis, small sample size, acquisition of the distribution of chemical elements in the sample, and mapping in two dimensions. The four techniques described above analyze total contents. PIXE and XRF have higher sensitivity than the other two to quantify trace elements in concentrations of parts per million, and these two,

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2019. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 54: 413-434. 2020.

similares en sus fundamentos. Estas técnicas, a diferencia de las anteriores, no requieren solubilizar la muestra o su preparación es mínima. Otras ventajas son su rapidez, la realización de análisis multielemental simultáneo, tamaño pequeño de muestra, adquisición de la distribución de elementos químicos en la muestra y generar mapas en dos dimensiones. Las cuatro técnicas descritas más arriba analizan contenidos totales. PIXE y XRF presentan mayor sensibilidad que las otras dos para cuantificar elementos traza en concentraciones de partes por millón, y estas dos más EDS se pueden acoplar a microscopios *ad hoc* para obtener la distribución de elementos químicos y hacer mapeos. La técnica XPS permite analizar fracciones iónicas en estudios de estados de oxidación de los elementos, pero las concentraciones en las muestras deben ser superiores a 0.1% en peso. Las aplicaciones de las técnicas no destructivas generan información complementaria a las clásicas y aportan conocimiento básico. Otras ventajas es que la preparación de las muestras requiere menos tiempo, excepto cuando se requieren mapeos. Su capacidad para ejecutar multianálisis permite reducir costos. En México y otros países hay grupos de investigación especializados en estas técnicas, pero es necesario desarrollar e implementar aplicaciones para realizar análisis de matrices biológicas como vegetales (semillas, hojas, etc.), alimentos, abonos y matriz orgánica de los suelos. Un conocimiento más profundo de estas técnicas permitirá la interacción de grupos de investigación y generar información para estudios de ciencia básica en agronomía y alimentos.

Palabras clave: técnicas analíticas no convencionales, XPS, PIXE, XRF, EDS, ICP-MS.

INTRODUCCIÓN

El análisis de la concentración total de los elementos esenciales y de algunos potencialmente tóxicos para las plantas, se realiza por lo general mediante métodos convencionales que requieren la destrucción física o solubilización de la matriz de la muestra. En décadas recientes el análisis de plantas ha dado un salto cualitativo y cuantitativo y hay metodologías analíticas con instrumentos que no lo requieren. Estas técnicas actuales se emplean para determinar elementos totales y algunas permiten analizar especies iónicas (Tezotto *et al.*, 2013).

Entre los análisis convencionales se encuentran las espectrometrías de emisión atómica (AES, atomic emission spectrometry), absorción (AAS, atomic absorption spectrometry), emisión por atomización con plasma inductivamente acoplado (ICP, inductively coupled plasma) y la de ICP masas (ICP-MS,

in addition to EDS, can be coupled to *ad hoc* microscopes to obtain the distribution of chemical elements and mapping. The XPS technique allows the analysis of ionic fractions in studies of oxidation states of the elements, but the concentrations in samples must be greater than 0.1% by weight. The applications of non-destructive techniques generate complementary information to classic ones and provide fundamental knowledge. Besides, sample preparation requires less time, except when mapping is required. Its ability to run multi-analysis allows for reducing costs. In Mexico and other countries, there are research groups specialized in these techniques. Still, it is necessary to develop and implement applications to perform analyzes of biological matrices such as vegetables (seeds, leaves, and others), food, fertilizers, and soil organic matrix. More in-depth knowledge of these techniques allows the interaction of research groups and generate information for basic science studies in agronomy and food.

Key words: unconventional analytical techniques, XPS, PIXE, XRF, EDS, ICP-MS.

INTRODUCTION

The analysis of the total concentration of the essential elements and potentially toxic to the plants is generally performed through conventional methods that require the physical destruction or solubilization of the sample matrix. In recent decades the analysis of plants has taken a qualitative and quantitative leap, and there are analytical methodologies with instruments that do not require such solubilization. These latter techniques are used to determine total elements content, and some allow the analysis of ionic species (Tezotto *et al.*, 2013).

Conventional analyzes include atomic emission spectrometry (AES), absorption (AAS, atomic absorption spectrometry), inductively coupled plasma atomization (ICP), and mass ICP (ICP-MS). The AES and AAS techniques are the most used in laboratories in less developed countries. However, ICP and ICP-MS have advantages, such as the simultaneous analysis of the total contents of most of the essential elements for plant growth, in particular, those for human consumption and determine the presence of contaminating or toxic metallic elements.

The interaction of matter with various particles of the electromagnetic spectrum offers a range of possibilities for measurements (Grieken, 2004). Thus, X-ray radiation is used in genetic, agronomic, plant

mass spectrometry with inductive coupling plasma). Las técnicas AES y AAS son las más usadas en los laboratorios de los países menos desarrollados. Sin embargo, ICP e ICP-MS presentan ventajas, como análisis simultáneo de los contenidos totales de la mayoría de los elementos esenciales para el crecimiento de los vegetales, en particular, de aquellos para consumo humano y determinar la presencia de elementos metálicos contaminantes o tóxicos.

La interacción de la materia con diversas partículas del espectro electromagnético ofrece un abanico de posibilidades para mediciones (Grieken 2004). Así, las radiaciones con rayos X se usan en investigaciones genéticas, agronómicas, de nutrición vegetal y fisiología, para mejorar variedades de granos, frutales y otros cultivos; para evaluar la composición y calidad nutricional de alimentos; cuantificar elementos metálicos esenciales potencialmente contaminantes y tóxicos; diagnosticar el estado nutricional de los cultivos; y generar alimentos funcionales. Estas técnicas son aplicables a otros materiales orgánicos e inorgánicos, como los componentes presentes en los suelos que soportan las plantas y los fertilizantes para su nutrición. Su base es la interacción de los rayos X con la materia vegetal o los suelos, son técnicas rápidas, admiten muestras de tamaño pequeño y se puede adquirir mapas en dos dimensiones de la distribución de elementos químicos sin destruir la muestra (van der Ent *et al.* 2018; de Carvalho *et al.*, 2018). Las técnicas basadas en la interacción con los rayos X con la materia se pueden usar en combinación con ICP e ICP-MS (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018), y aquellas con base en la interacción de las radiaciones electromagnéticas del rango infrarrojo (NIR, MIR) tienen otras cualidades que no se presentan en este ensayo por razones de espacio.

El objetivo de este ensayo es presentar los principios básicos de ICP-MS, una técnica destructiva convencional y de técnicas no destructivas, como la fotoemisión de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), la emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE, particle induced X-ray emission), la fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence), y la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy), para facilitar el

nutrition, physiology research to improve varieties of grains, fruit, and other crops; as well as, to evaluate the composition and nutritional quality of food; quantify essential, potentially polluting and toxic metallic elements; diagnose the nutritional status of crops, and generate functional food. These techniques are applied to other organic and inorganic materials, like the components present in the soil that support the plants and fertilizers for their nutrition. They are based on the interaction of X-rays with plant matter or soils, are fast, admit small-sized samples, and two-dimensional maps of the distribution of chemical elements can be obtained without destroying the sample (van der Ent *et al.*, 2018; de Carvalho *et al.*, 2018). Techniques based on the interaction of X-rays with matter can be used in combination with ICP and ICP-MS (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018) and those based on the interaction of electromagnetic radiation of the infrared range (NIR, MIR) have other qualities that are not addressed in this essay for reasons of space.

The objective of this essay is to present the basic principles of ICP-MS, a conventional destructive technique, as well as, non-destructive techniques, such as X-ray photoemission (XPS, X-ray photoelectron spectrometry), particle-induced X-ray emission (PIXE), X-ray fluorescence (XRF), X-ray energy dispersion spectrometry (EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy) to facilitate the access of researchers in an area of knowledge generally unrelated to their training, and examples of their applications are given.

Techniques that require the destruction of the sample

Mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS)

The ICP-MS is a spectrometry of increasing interest for the simultaneous analysis of total contents of macro and trace elements in plant material and others. The advantage of this technique is to be highly sensitive. It can quantitatively determine nearly all the elements present in the periodic table with ionization potential less than Argon (Ar), to measure nanogram concentrations per kilogram or parts per trillion (ppt). Its basis is the generation of ions by using a plasma; a mass spectrometer separates and detects ions. The Ar gas transports the solubilized sample

acceso de los investigadores a un área del conocimiento por lo general ajena a su formación y se dan ejemplos de sus aplicaciones.

Técnicas que requieren destrucción de la muestra

Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La ICP-MS es una espectrometría de interés creciente para el análisis de contenidos totales simultáneos de elementos macro y traza, en material vegetal y otros. La ventaja de esta técnica es ser altamente sensible y puede determinar cuantitativamente casi todos los elementos presentes en la tabla periódica con potencial de ionización menor al del Argón (Ar), para medir concentraciones de nanogramo por kilo o partes por trillón (ppt). Su fundamento es la generación de iones con un plasma y un espectrómetro de masas separa y detecta los iones. La muestra solubilizada es transportada por el gas Ar con una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol. Este último es conducido a la zona de ionización generada al someter el flujo de Ar, a la acción de un campo magnético oscilante (inducido por una corriente de alta frecuencia) para formar un plasma. En el interior del plasma se puede alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. Los iones pasan al interior del filtro cuadrupolo a través de una interfase de vacío creciente y son separados según su relación masa/carga (m/z). Cada una de las masas sintonizadas llegan al detector donde se evalúa su abundancia en la muestra (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Los principios del ICP sin acoplamiento de masas, una técnica de uso frecuente en laboratorios de rutina e investigación, y los de espectrometría ICP-MS son similares; ambos se basan en la producción y detección de líneas espectrales procedentes de elementos excitados al alcanzar el estado de vapor atómico o plasma. Este vapor atómico tiene propiedades físicas únicas que lo hacen un agente óptimo para vaporizar, atomizar, ionizar y excitar a los componentes de la muestra (Soltanpour *et al.*, 1996). La diferencia

with a peristaltic pump to the nebulizer system, to form an aerosol. The latter is led to the ionization zone generated by subjecting the flow of Ar to the action of an oscillating magnetic field (induced by a high frequency current) to generate a plasma. Inside the plasma temperatures can reach up to 8000 K. The ions pass into the quadrupole filter through an increasing vacuum interface and are separated according to their mass/charge ratio (m/z). Each of the tuned masses arrive to a detector to evaluate its abundance (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

The principles of ICP, a technique often used in routine laboratories and research, and those of ICP-MS spectrometry are similar. Both are based on the production and detection of spectral lines that come from excited elements upon reaching the state of atomic vapor or plasma. This atomic vapor has unique physical properties that make it an optimal agent to vaporize, atomize, ionize and excite the sample components (Soltanpour *et al.*, 1996). The difference between an ICP device and an ICP-MS is that the latter has an attachment that allows to identify the mass of the measured elements. The ICP-MS apparatus mainly analyzes atomic species, and in more advanced versions its isotopes. The ICP-MS analysis, like other types of atomic spectrometry (ICP, EAS and AAS) and conventional techniques for chemical analysis of agricultural materials (plants, soils and others), requires solubilization of the chemical elements present in solid samples with chemical oxidizing agents (HClO_4 , H_2O_2 or others) (Tezotto *et al.*, 2013). Those chemical species solubilized by oxidation of the solid sample generate molecules and ions in a gaseous fluid. Ions are separated based on their m/z ratio in a quadrupole or mass filter and are detected and quantified. The ICP-MS equipment have four main components: a sample introduction system that can be direct, indirect or from a gas chromatograph; a source of ions that can be of electronic or chemical impact; an electrostatic acceleration-analyzer system to separate the ions, which can be of magnetic sector, quadrupole or flight time; a detector system; and the reading device (Rubinson and Rubinson, 2001). The complete system requires a high vacuum throughout the spectrometer, from the introduction of samples to ionic detection. Mass spectrometers are of two types: atomic mass and molecular mass.

entre un equipo ICP y un ICP-MS es que este último posee un aditamento que permite identificar la masa de los elementos medidos. Con ICP-MS se analizan principalmente especies atómicas y en sus versiones más avanzadas, sus isótopos; este análisis ICP-MS, como otros tipos de espectrometría atómica (ICP, EAS y AAS) y técnicas convencionales de análisis químico de materiales agrícolas (vegetales, suelos y otros), requiere que los elementos químicos en las muestras sólidas se solubilizan con agentes químicos oxidantes (HClO_4 , H_2O_2 u otros) (Tezotto *et al.*, 2013). Aquellas especies químicas solubilizadas por oxidación de la muestra sólida generan moléculas y iones en un fluido gaseoso. Los iones se separan en función de su relación m/z en un cuadrupolo o filtro de masas, y son detectados y cuantificados. Los equipos ICP-MS tienen cuatro componentes principales: un sistema de introducción de la muestra que puede ser directa, indirecta o desde un cromatógrafo de gases; una fuente de iones que puede ser de impacto electrónico o químico; un sistema electrostático de aceleración-analizador para separar los iones que puede ser de sector magnético, cuadrupolo o tiempo de vuelo; un sistema detector; y el dispositivo de lecturas (Rubinson y Rubinson, 2001). El sistema completo requiere tener un alto vacío en todo el espectrómetro, desde la introducción de muestras hasta la detección iónica. Los espectrómetros de masas son de dos tipos: de masa atómica y de masa molecular.

La atomización de las muestras se realiza con ablación láser (una aplicación útil cuando se manejan muestras sólidas, lo cual evita el uso de digestión o solubilización con ácidos y bases fuerte según Chirinos *et al.*, 2017); por chispa; o por descarga luminiscente. Para ionizar los elementos en solución, según el tipo de equipo y edad, se utiliza irradiación con electrones, fotones, iones o moléculas, o con procesos térmicos o eléctricos (Fernández-Ruiz, 2008).

El filtro de masas o cuadrupolo que separa los iones por su relación m/z es el sistema más usado en los espectrómetros de masas atómicas. Está formado por un conjunto de barras cilíndricas paralelas que funcionan como electrodos, con cargas contrarias; a cada par de barras se aplican potenciales variables de corriente alterna y de

The atomization of the samples is carried out by laser ablation (useful application when handling solid samples, which avoids the use of digestion or solubilization with strong acids and bases, according to Chirinos *et al.*, 2017); spark; or by luminescent discharge. The ionization of the elements in solution is done by irradiation with electrons, photons, ions or molecules, or with thermal or electrical processes, depending on the type of equipment and age (Fernández-Ruiz, 2008).

The mass filter or quadrupole that separates the ions by their ratio m/z is the most used system in atomic mass spectrometers and consist of a set of parallel cylindrical bars that function as electrodes, with opposite charges, potential alternating current and radiofrequency variables applied to each pair of bars. The ions inside this device are accelerated by a potential of 5 to 10 V. By varying the radiofrequency parameters of the quadrupole, the ions affect the detector in suitable ranges of m/z values, to separate its isotopes. The mass spectra in this system obtained by scanning the potential applied to the bars or electrodes are related to the m/z of the isotopes and elements (Abián *et al.*, 2008).

To calibrate the ICP-MS to study various materials, including plant analyses and soil solutions, AAS, AES, and ICP techniques are used (Masson *et al.*, 2010). The ICP-MS is less accurate and precise than conventional atomic spectrometric techniques for analyzing essential elements (macro and micro) in the plant, soil, and other samples. But this last technique shows greater precision and sensitivity for the analysis of trace elements (Chirinos *et al.*, 2017; Masson *et al.*, 2010; Soltanpour *et al.*, 1996). The ICP-MS can detect metals and non-metals elements in concentrations as low as parts per trillion (Caughlin, 2010; Chirinos *et al.*, 2017; Ruvalcaba, 2013); these concentrations are characteristic of rare earth (Caughlin, 2010), so their use is frequent in environmental studies (Caughlin, 2010; Masson *et al.*, 2010; Ruvalcaba, 2013). The ICP-MS analysis cost is usually higher than the AAS, AES and ICP techniques, but it is compensated by the ability to simultaneously analyze macro, micro and trace elements (Chirinos *et al.*, 2017; Soltanpour *et al.*, 1996), and some instruments can analyze isotopes. With ICP and ICP-MS it is possible to measure elements such as P, S, which cannot be evaluated in AAS and AES devices (Soltanpour *et al.*, 1996).

radiofrecuencia. Los iones al interior de este dispositivo son acelerados por un potencial de 5 a 10 V. Al variar los parámetros de radiofrecuencia del cuadrupolo, los iones inciden en el detector en rangos adecuados de valores m/z , para separarlos en isótopos. Los espectros de masas en este sistema se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras o electrodos relacionado a la m/z de los isótopos y elementos (Abián *et al.*, 2008).

Para calibrar el ICP-MS en el estudio de materiales diversos, incluidos los análisis vegetales y disoluciones de suelos, se usan las técnicas AAS, AES e ICP (Masson *et al.*, 2010). La ICP-MS es menos exacta y precisa que las técnicas atómicas convencionales para analizar elementos esenciales (macro y micro) en muestras vegetales, suelos y otros. Pero esta última técnica ha mostrado mayor precisión y sensibilidad para el análisis de elementos traza (Chirinos *et al.*, 2017; Masson *et al.*, 2010; Soltanpour *et al.*, 1996). La ICP-MS puede detectar metales y elementos no metálicos en concentraciones tan bajas como partes por trillón (Caughlin, 2010; Chirinos *et al.*, 2017; Ruvalcaba, 2013); estas concentraciones son características de las tierras raras (Caughlin, 2010), por lo que su uso es frecuente en estudios ambientales (Caughlin, 2010; Masson *et al.*, 2010; Ruvalcaba, 2013). El costo de análisis de ICP-MS suele ser elevado en comparación con las técnicas AAS, AES e ICP, pero se compensa por la capacidad de analizar simultáneamente elementos macro, micro y traza (Chirinos *et al.*, 2017; Soltanpour *et al.*, 1996), y algunos equipos pueden analizar isótopos. Con ICP e ICP-MS es posible medir elementos como P y S, que no se pueden evaluar en aparatos de AAS y AES (Soltanpour *et al.*, 1996).

El detector de los iones produce la multiplicación y amplificación en cascada de las señales en nanosegundos. La espectrometría ICP-MS es sensible y rápida, pero presenta interferencias espectrales y no espectrales (Fernández-Ruiz, 2004). Las interferencias espectrales pueden ser: isobáricas, es decir, de elementos que presentan masas nominales semejantes (*v.g.* $^{58}\text{Ni}^+$, $^{58}\text{Fe}^+$); por presencia de iones poliatómicos (*v.g.* ^{48}Ti , ^{31}P , ^{16}O), que incluye elementos presentes en el sistema (*v.g.* $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{16}\text{O}_2^{+2}$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{OH}^+$); por

The ion detector produces the multiplication and amplification in a cascade of the signals in nanoseconds. The ICP-MS spectrometry is sensitive and fast but has spectral and non-spectral interference (Fernández-Ruiz, 2004). The spectral interferences can be: isobaric, that is, of elements that have similar nominal masses (*e.g.* $^{58}\text{Ni}^+$, $^{58}\text{Fe}^+$) due to the presence of polyatomic ions (*e.g.* ^{48}Ti , ^{31}P , ^{16}O), which includes elements present in the system (*e.g.* $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{16}\text{O}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{OH}^+$); by the formation of doubly charged molecules (M^{2+} , *e.g.* ArO^+ , ArH^+) or because they come from the sample matrix. Nonspectral interferences are attributed to the sample matrix. They can be total dissolved solids; elements of high masses that affect their balance with low masses; easily ionizable elements such as Na and K, or by the formation of oxides. Spectral interferences are minimized: when those interference-free isotopes are measured (*e.g.* ^{105}Ba instead of ^{106}Ba); by the use of a cold plasma (with reactive gases - H_2 , O_2 , NO , NO_2 , CH_4 , NH_3 , or with inert gases - He, Kr, Xe) that prevents the formation of oxides and M^{2+} (Fernández-Ruiz, 2004). Nonspectral interferences are minimized: diluting the sample, by the elimination of the matrix and by the use of internal standards (of concentration and ionizing potential analogous to that of the analyte and not present in the sample). Procedures such as chelation, chromatography or desolvation, mathematical corrections, use of collision/reaction cells within the quadrupole (octopoles) allow eliminating matrix effects, such as the presence of solids (Chirinos *et al.*, 2017).

Mass spectrometry is a technique with various applications in the chemical analysis of plant material, for example, to detect atomic and molecular species in various organic materials and quantify them. For this, the spectrometers must be coupled with gas and liquid chromatographic devices. The ICP-MS spectrometry is also used to study isotopic speciation, especially in environmental studies, and in the research of reaction mechanisms and tracers. Queralt *et al.* (2005) analyzed with ICP, ICP-MS and XRF essential microelements for plants and some potentially toxic elements (Cu, Mn, Zn and As, Rb, Sr, Pb, Ti) in concentrations of micrograms per liter to characterize and control the quality of infusions of medicinal plants. The comparison between the measurement of ICP-MS and ICP produced similar results. Guelke-Stelling and von Blanckenburg

formación de moléculas doblemente cargadas (M^{2+} , *v.g.* ArO^- , ArH^-) o porque son aportadas por la matriz de la muestra. Las interferencias no espectrales se atribuyen a la matriz de la muestra. Pueden ser: sólidos disueltos totales; elementos de masas altas que afectan el balance de éstas con las masas bajas; elementos fácilmente ionizables como Na y K o por formación de óxidos. Las interferencias espectrales se minimizan: cuando se miden aquellos isótopos libres de interferencias (*v.g.* ^{105}Ba en lugar de ^{106}Ba); por el uso de un plasma frío (con gases reactivos - H_2 , O_2 , NO , NO_2 , CH_4 , NH_3 , o con gases inertes - He, Kr, Xe) que evita la formación de óxidos y M^{2+} (Fernández-Ruíz, 2004). Las interferencias no espectrales se minimizan: al diluir la muestra, por eliminación de la matriz y por uso de patrones internos (de concentración y potencial ionizador, análogos al del analito y que no estén presentes en la muestra). Los procedimientos como la quelación, cromatografía o desolvatación, correcciones matemáticas, uso de celdas colisión/reacción dentro del cuadrupolo (octapolos) permiten eliminar los efectos matriciales, como por ejemplo la presencia de sólidos (Chirinos *et al.*, 2017).

La espectrometría de masas es una técnica con diversas aplicaciones en el análisis químico de material vegetal; por ejemplo, para detectar especies atómicas y moleculares en diversos materiales orgánicos y cuantificarlas. Para ello, los espectrómetros se tienen que acoplar con cromatógrafos de gases y líquidos. La espectrometría ICP-MS también se emplea para estudiar la especiación isotópica, en especial en estudios ambientales, así como en la investigación de mecanismos de reacción y en el estudio de trazadores. Queralt *et al.* (2005) analizaron con ICP, ICP-MS, y XRF, microelementos esenciales para las plantas y algunos potencialmente tóxicos (Cu, Mn, Zn y As, Rb, Sr, Pb, Ti) en concentraciones de microgramos por litro para caracterizar y controlar la calidad de infusiones de plantas medicinales. La comparación entre la medición de ICP-MS e ICP produjo resultados similares. Guelke-Stelling and von Blanckenburg (2012) estudiaron el fraccionamiento del Fe-isotópico con ICP-MS en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. y *Avena sativa* L., en tres etapas del desarrollo, que difícilmente se pudiera hacer con otra técnica.

(2012) studied the fractionation of Fe-isotopic with ICP-MS in *Phaseolus vulgaris* L. and *Avena sativa* L. plants, in three stages of development, which could hardly be done with another technique.

Other techniques that employ mass spectrometry

ICP-MS coupled to a high-performance liquid chromatograph

Zheng *et al.* (2013) quantified and studied the distribution of arsenic (As) and dimethyl arsenic acid (DMA) in different rice plants with an ICP-MS coupled to a liquid chromatograph (HPLC-ICP, High-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry) and supplemented with X-ray fluorescence (XRF). The DMA induces toxicity in rice reproductive tissues and reduces grain yield, while As only accumulated in vegetative tissues and did not affect its yield.

ICP with laser ablation coupled to triple quadrupole mass spectrometer

Thyssen *et al.* (2018) obtained bio-images of the distribution of Cd and Pb contaminants and essential elements P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, and Zn, in cocoa beans using triple quadrupole mass spectrometry coupled with ICP with laser ablation (LA-ICP-TQMS, Laser ablation-inductively coupled plasma-triple quadrupole mass spectrometry). The analysis of solid samples with laser ablation avoided common isobaric or polyatomic interference in the ICP-MS analysis for elements such as Ca or Fe and the exact and precise determination of low concentrations of Cd and Pb.

Secondary ion mass spectrometry (SIMS)

Secondary ion mass spectrometry (SIMS) is an analytical technique for the study of the distribution of liquid or solid sample analytes, which are converted to the gaseous state. SIMS is used for plant samples analysis. Small concrete points on the surface of the sample are bombarded with a beam of primary ions (atoms or fragmented molecules, for example, Cs^+ or O^{2+}) in an energy range between 0.5-100 KeV. These energetic ions expel ions from the surface of the material, called secondary ions; the ejected material is in a gaseous state and can be analyzed using a mass

Otras técnicas que emplean espectrometría de masas

ICP- MS acoplado a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Zheng *et al.* (2013) cuantificaron y estudiaron la distribución de arsénico (As) y ácido dimetilarsénico (ADMA) en diferentes plantas de arroz con un ICP-MS acoplado a un cromatógrafo de líquidos (HPLC-ICP, High-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry) y complementado con fluorescencia de rayos X (XRF). El ADMA induce toxicidad en los tejidos reproductivos del arroz y reduce el rendimiento del grano, mientras que el As sólo se acumuló en los tejidos vegetativos y no afectó su rendimiento.

ICP con ablación por láser acoplado a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo

Thyssen *et al.* (2018) obtuvieron bioimágenes de la distribución de contaminantes de Cd y Pb y de elementos esenciales P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu y Zn, en granos de cacao mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo acoplado con ICP con ablación láser (LA-ICP-TQMS, Laser ablation-inductively coupled plasma-triple quadrupole mass spectrometry). El análisis de las muestras sólidas con ablación láser evitó interferencias isobáricas o poliatómicas comunes en el análisis ICP-MS para elementos como Ca o Fe y la determinación exacta y precisa de concentraciones bajas de Cd y Pb.

Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)

La SIMS (Secondary ion mass spectrometry) es una técnica analítica para el estudio de la distribución de los analitos de muestras líquidas o sólidas que son convertidas al estado gaseoso y se ha usado para muestras vegetales. Pequeños puntos concretos de la superficie de la muestra se bombardean con un haz de iones primarios (átomos o moléculas fragmentadas, por ejemplo, Cs^+ u O_2^+) en un intervalo de energía de 0.5 a 100 KeV. Estos iones energéticos expulsan iones de la

spectrometer. The mass and abundance of ions in the gaseous state are measured by SIMS in the following sequence: generation of molecules in the gas phase (and fragments of molecules and atoms), ionization, separation according to their mass and detection of ion peaks (Rubinson and Rubinson, 2001). The SIMS technique allows measuring m/z ratios of these secondary ions to determine their elemental, isotopic or molecular composition. Metzner *et al.* (2008) used flight time SIMS coupled with scanning electron microscopy and a cryogenic procedure (TOF-SIMS and SEM, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron microscope) to study macronutrient transport routes, as well as their distribution at the cell level *in situ* in fresh bean tissue. Ionization with this flight time spectrometer (TOF) is done by a pulse of energy on the sample; with the thermal shock, molecules are positively or negatively charged and go into the gas phase. Although this technique has a moderate resolution, it allows detecting all the ions projected by the ionization source (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Techniques that do not require destruction of the sample

In this essay the techniques that use X-rays (wavelength between 10 and 0.01 nm) were considered to perform elementary analysis, based on the interaction of electromagnetic radiation (REM) with the material to be analyzed. The REM is generated by the deceleration of high-energy charged particles (photons, electrons, or protons) when they hit a metallic target (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). These particles interact with the electrons of internal energy levels of the atoms in the sample, excites, and expels them, which generates gaps in the corresponding orbital. Other electrons with more external and higher energy levels fill these empty spaces, generating X-rays.

The use of XPS, PIXE, XRF, EDS techniques applies to the identification of total essential elements and trace in plants; some of the latter may be potentially contaminating in soils. The name of microanalysis techniques is because they handle small sample sizes. The PIXE, XRF, EDS and WDS techniques can work in combination with microscopes to generate distribution maps of

superficie del material, llamados iones secundarios; el material eyectado queda en estado gaseoso y puede analizarse mediante un espectrómetro de masas. La masa y la abundancia de iones en estado gaseoso por SIMS se mide en la siguiente secuencia: generación de moléculas en fase gaseosa (y fragmentos de moléculas y átomos), ionización, separación según su masa y detección de los picos de los iones (Rubinson and Rubinson, 2001). La técnica SIMS permite medir relaciones m/z de estos iones secundarios para determinar su composición elemental, isotópica o molecular. Metzner *et al.* (2008) usaron SIMS de tiempo de vuelo acoplado con microscopía electrónica de barrido y un procedimiento criogénico (TOF-SIMS and SEM, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron microscope) para estudiar las rutas de transporte de macronutrientes y su distribución a nivel de célula *in situ*, en tejido fresco de frijol. La ionización con este espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) se hace mediante un pulso de energía sobre la muestra; con el golpe térmico las moléculas se cargan positiva o negativamente y se proyectan a la fase gaseosa. Aunque esta técnica tiene una resolución moderada permite detectar todos los iones proyectados por la fuente de ionización (Sedgwick and Hindenlang, 1996).

Técnicas que no requieren destrucción de la muestra

En este ensayo se consideraron técnicas que emplean rayos X (longitud de onda entre 10 y 0.01 nm) para realizar análisis elemental y su base es la interacción de la radiación electromagnética (REM) con el material que se analiza. Las REM se generan por la desaceleración de partículas cargadas de alta energía (fotones, electrones o protones) al chocar con un blanco metálico (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Estas partículas interactúan con los electrones de niveles energéticos internos de los átomos de la muestra, los excita y expulsa, lo cual genera vacíos en el orbital correspondiente. Otros electrones de niveles energéticos más externos y de mayor energía llenan estos espacios vacíos y se generan los rayos X.

the concentration of chemical elements (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). These techniques are complementary to the conventional ones used to determine chemical elements in materials of different nature. The basic of these techniques are presented below.

X-ray photoemission spectrometry (XPS)

X-ray photoemission spectrometry is based on bombarding an atom of solid material with a photon (generated by X-rays), with enough energy to eject an electron from the atom (Figure 1) (Vempati *et al.* 1996). Energy greater than 1000 eV is required to separate the electron from the atom corresponding to the binding energy (Rubinson and Rubinson, 2001). The energy of electrons can only come from the first layers of the atom. The most used lines are AlK (1486.6 eV) and MgK (1253.6 eV) (Vempati *et al.*, 1996).

An electron of a higher energy level occupies the gap left by the ejected electron. As a result of photoemission, the internal recombination of energy occurs in the excited atom, including the expulsion of a second electron from external levels called Auger electrons. The emission of electrons of this type is the basis of the Auger surface spectrometry, but it is not addressed in this essay.

The speed and bond energy (EL) of the expelled electrons are characteristic of each element. According to Vempati *et al.* (1996), small changes in the binding energy (50 eV) may reflect differences in the chemical state of the atom, which allows obtaining stoichiometric information on quantification of ionic species, the oxidation state, and the electronic structure.

The XPS spectrometry is a surface analysis technique; the penetration depth of the photon beam does not exceed 1 to 2 nm. It is non-destructive and a total analysis technique; it is multi-elemental, but does not include hydrogen; it is semi-quantitative (error ± 10 and 20%), and quantitative; and is used to analyze the qualitative, quantitative composition, and the chemical state of the elements on the surface of a material. The sensitivity of XPS depends on the concentration of the element in the matrix, as well as its purity. The analysis of a heterogeneous matrix with of low concentration of the analyte is less sensitive than a homogeneous matrix. The essential

Las técnicas XPS, PIXE, XRF, EDS se usan para identificar elementos esenciales y traza totales; algunos de los últimos pueden tener potencial contaminante en los suelos. El nombre técnicas de microanálisis se debe a que manejan tamaños de muestra muy pequeños. PIXE, XRF, EDS y WDS pueden funcionar combinadas con microscopios para generar mapas de distribución de la concentración de elementos químicos (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Estas técnicas son complementarias a las clásicas usadas para determinar elementos químicos en materiales de distinta naturaleza. A continuación, se presentan fundamentos de estas técnicas y ejemplos de su aplicación en el estudio de material vegetal y de suelos.

Espectrometría de fotoemisión de rayos X (XPS)

La XPS se basa en bombardear un átomo de un material sólido con un fotón (generado por rayos X), con suficiente energía para expulsar un electrón del átomo (Figura 1) (Vempati *et al.*, 1996). Se requiere una energía mayor a 1000 eV para separar al electrón del átomo correspondiente a la energía de enlace (Rubinson y Rubinson,

components of an XPS spectrometer are an ultra-high vacuum chamber, an X-ray source (electron beam), an electron counter, a detector, and a data acquisition and processing system (Figure 2).

Measurement with XPS requires ultra-high vacuum conditions, less than 10^{-7} pascals, or 100 nanopascals. Turbo-molecular and rotary oil vacuum pumps generate the vacuum (Barr *et al.*, 1999; Vempati *et al.*, 1996). The development of new materials such as polymers and adhesives, metallurgy, heterogeneous catalysis, corrosion studies, and in the characterization of solid surfaces use this technique (Fadley, 2010). Still, there is little information on its use to study mineral elements in plant material, because XPS detection limits (more than 0.1%) (Hofmann, 2012) are above the average concentrations of elements in these materials. However, XPS can be useful in studies of physiological processes, and to study the contamination of plant material. For example, Reyes-Moreno *et al.* (1993) reported that the oxidation of lipids from bean seeds intervened in the hardening of the seed coat. This phenomenon can be studied with XPS as a complement to other analytical methodologies, as suggested by Hoffman (2012).

In soils, XPS allows the study of adsorption, dissolution, and precipitation processes of ions in

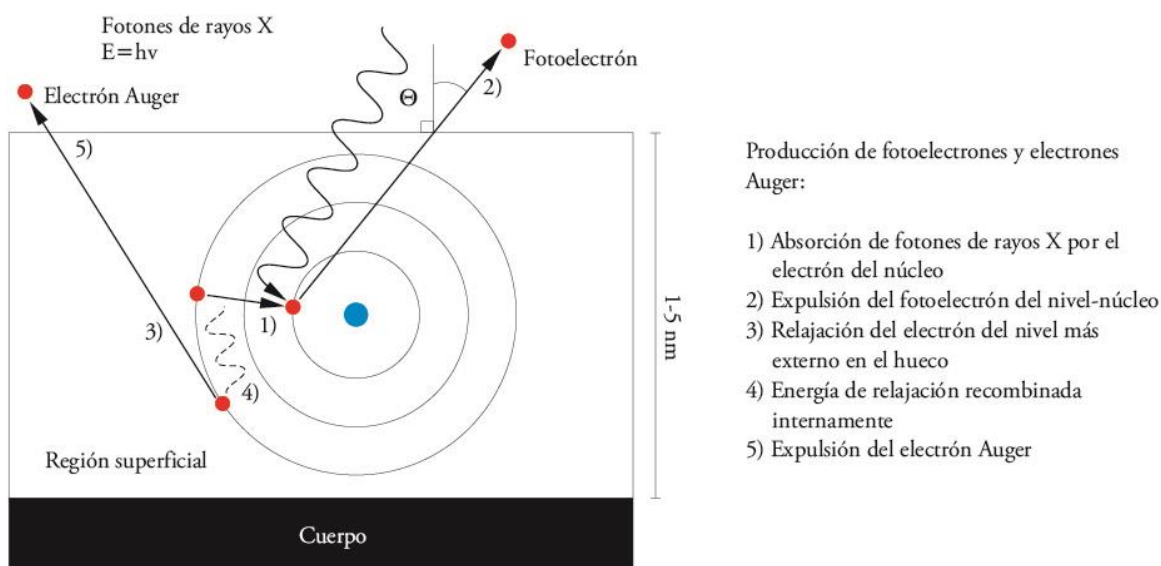


Figura 1. Esquema del proceso de fotoemisión y del electrón Auger inducido por el bombardeo de rayos X (Vempati *et al.*, 1996).
Figure 1. Scheme of the photoemission process and the Auger electron induced by X-ray bombardment (Vempati *et al.*, 1996).

2001). La energía de los electrones sólo puede provenir de las primeras capas del átomo. Las líneas más usadas son AlK (1486.6 eV) y MgK (1253.6 eV) (Vempati *et al.*, 1996).

Un electrón de un nivel energético mayor ocupa el hueco dejado por el electrón expulsado. Como resultado de la fotoemisión se produce una recombinación interna de energía en el átomo excitado, incluyendo la expulsión de un segundo electrón de los niveles externos llamados electrones Auger. La emisión de electrones de este tipo es la base de la espectrometría de superficie Auger, el cual no se trata en este ensayo.

La velocidad y la energía de enlace (EL) de los electrones expulsados son características de cada elemento. Según Vempati *et al.* (1996), pequeños cambios en la energía de enlace (50 eV) pueden reflejar diferencias en el estado químico del átomo, lo cual permite obtener información estequiométrica sobre cuantificación de especies iónicas, el estado de oxidación y la estructura electrónica.

La XPS es una técnica de análisis de superficie, porque la profundidad de penetración del haz de fotones en la muestra no supera 1 a 2 nm; es no destructiva y de análisis total; es multielemental, pero no incluye al hidrógeno; es semicuantitativa (error ± 10 y 20%), y cuantitativa; y se usa para analizar la composición cualitativa, cuantitativa, y el estado químico de los elementos en la superficie de un material. La sensibilidad de XPS depende de la concentración del elemento en la matriz y de la pureza de ésta última. El análisis de una matriz heterogénea y con baja concentración del analito de interés, será menos sensible. Los componentes básicos de un espectrómetro XPS son: una cámara de ultra alto vacío, una fuente de rayos X (haz de electrones), un contador de electrones, un detector y un sistema de adquisición y procesamiento de datos (Figura 2).

La medición con XPS requiere condiciones de ultra alto vacío, inferiores a 10^{-7} pascal o 100 nanopascals. El control de vacío se consigue mediante bombas turbo-moleculares y rotatorias de aceite (Barr *et al.*, 1999; Vempati *et al.*, 1996). Esta técnica se usa en el desarrollo de nuevos materiales como polímeros y adhesivos, metalurgia, catálisis heterogénea, estudios de corrosión, y en

the environment and their components, which previously underwent experimentation exclusively in solutions (Vempati *et al.*, 1996). A more recent application is the mapping of a region of solid soil samples to study the chemistry of silicates and their association with biological materials, with a spatial resolution of 10 mm (Barr *et al.*, 1999).

Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE)

The PIXE technique basis is the detection of the X-rays emitted when a beam of charged particles interacts with atom electrons in a sample (Figure 3A). The electrons of the internal layers are expelled and the excess energy of the atoms may be liberated through the emission of X-rays (van der Ent *et al.*, 2018). The energy of the emitted X-rays is equal to the energy difference between the levels of the transition, which is characteristic of each element. The particle beam can be protons or electrons of heavy atoms that are accelerated and acquire energy ranging from a few KeV to 10 MeV. The particle beam penetrates the sample linearly up to about 15 mm. The use of highly focused protons allows the obtention of one- and two-dimensional images of the distribution of chemical elements in the sample (Johansson *et al.*, 1995). Under this principle, PIXE is a total analysis technique that does not require atomization (Rubinson and Rubinson, 2001), whose detection limits are milligrams per kilogram or parts per million (ppm). And it is a non-destructive surface technique for the complete- multi-element analysis.

A PIXE spectrometer consists of an ultra-high vacuum chamber, a source of protons or electrons, and a nuclear accelerator (of the tandem or Van de Graaff type), a proton or electron analyzer, a detector and a counter (Figure 3B).

The detector of Si (Li) solid-state measures the energy of X-rays, which varies from 1 to 3 MeV (van der Ent *et al.*, 2018) and for heavy elements up to 10 MeV (Ruvalcaba, 2013). The efficiency of the detector is higher if the energy applied is 5 to 25 eV. In part, this determines the series of X-ray emission used for the analysis of elements according to their atomic number (Z). The PIXE technique allows analyzing more accurately elements with Z between 18 and 40 (van der Ent *et al.*, 2018). With PIXE, it is not possible to analyze light elements such as Na,

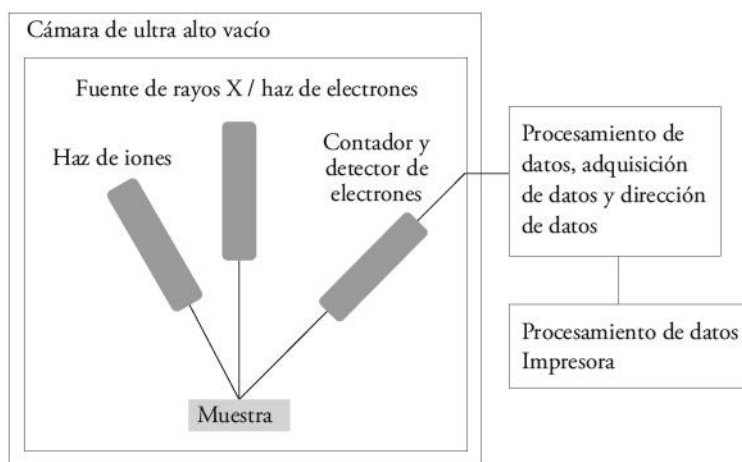


Figura 2. Componentes de un instrumento XPS (Hofmann, 2012).
Figure 2. Components of an XPS instrument (Hofmann, 2012).

la caracterización de superficies de sólidos (Fadley, 2010), pero hay poca información de su uso para estudiar elementos minerales en material vegetal. Esto podría atribuirse a que los límites de detección de XPS (mayor a 0.1%) (Hofmann, 2012) son superiores a las concentraciones normales de elementos, en estos materiales. Sin embargo, XPS puede ser útil en estudios de procesos fisiológicos y para investigar la contaminación de material vegetal. Por ejemplo, Reyes-Moreno *et al.* (1993) reportaron que la oxidación de los lípidos de las semillas de frijol intervenía en el endurecimiento de la testa. Este fenómeno se puede estudiar con XPS como complemento de otras metodologías analíticas, según lo sugiere Hoffman (2012).

En suelos, XPS permite estudiar procesos de adsorción, disolución y precipitación de iones en el ambiente y sus componentes, que antes se experimentaban exclusivamente en soluciones (Vempati *et al.*, 1996). Una aplicación más reciente es el mapeo de una región de muestras sólidas de suelo para estudiar la química de los silicatos y su asociación con materiales biológicos, con una resolución espacial de 10 mm (Barr *et al.*, 1999).

Espectrometría de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)

La técnica PIXE se basa en la detección de los rayos X emitidos cuando un haz de partículas

Al, Mg, and Si (Kuisma-Kursula, 2000), which are of interest in studies of plants and soils. The PIXE equipment is in nuclear physics laboratories, and its use is not for routine analysis purposes, because the device includes a particle accelerator. However, the micro version of PIXE is a technique used more frequently and increasingly presents new applications (Johansson *et al.*, 1995; Grieken, 2004).

The first use of the PIXE spectrometry was to analyze trace elements in thin leaves in semiconductors. Then the sample holders were modified to introduce and analyze geological, archaeological, forensic materials, and artistic objects where it is important not to alter the sample, and no vacuum is required. This technique is sensitive and fast to analyze these materials (Johansson *et al.*, 1995) and complement other techniques. Applications for the study of physiological processes in living plants were subsequently developed (van der Ent *et al.*, 2018).

Mesjasz-Przybyłowicz and Przybyłowicz (2002) used micro-PIXE to study physiological processes in plants at the cell level and determined essential nutrients and toxic elements. Micro-PIXE is a microprobe analysis technique that consists of applying the stable and focused beam of protons on micro samples or micro areas of larger specimens. The microprobes use modified optical microscopes to locate the area to be analyzed, direct the probe beam, and collect the analytical signal. With this procedure, it is possible to obtain one- and two-

cargadas interacciona con electrones de los átomos de una muestra (Figura 3A). Los electrones de las capas internas son expulsados y el exceso de energía de los átomos se puede liberar mediante la emisión de rayos X (van der Ent *et al.*, 2018). La energía de los rayos X emitidos es igual a la diferencia energética entre los niveles de la transición, la cual es característica de cada elemento. El haz de partículas puede ser de protones o electrones de átomos pesados que son acelerados y adquieren energía desde unos pocos KeV a 10 MeV. El haz de partículas penetra linealmente la muestra hasta unas 15 mm. El uso de protones altamente enfocados permite obtener imágenes de una y dos dimensiones de la distribución de elementos químicos en la muestra (Johansson *et al.*, 1995). Bajo este principio PIXE es una técnica de análisis total que no requiere atomización (Rubinson y Rubinson, 2001), cuyos límites de detección son de miligramos por kilogramos o partes por millón (ppm). Y es una técnica de superficie, no destructiva, para el análisis multielemental total.

Un espectrómetro PIXE se compone de una cámara de ultra alto vacío, una fuente de protones o electrones y un acelerador nuclear (del tipo tándem o Van de Graaff), un analizador de protones o electrones, un detector y un cuantificador (Figura 3B).

El detector de Si (Li) de estado sólido mide la energía de los rayos X que varía de 1 a 3 MeV (van

dimensional images of the distribution of chemical elements in the sample. Micro-PIXE has the potential to study the distribution of chemical elements in various materials and vegetables of interest in this essay. Progress in the application of this technique is subject in part to closer collaboration between biologists researching plants and the community of PIXE scholars to address the problems: sample preparation, refinement of analytical protocols, mainly in quantitative elementary mapping and interpretation of results. This essay seeks to enhance this type of interaction.

In this respect, Cvitanich *et al.* (2010) used ICP and PIXE to study the accumulation of Fe and ferritin in the seed coat and cotyledon of *Phaseolus* seeds. These studies are useful in the biofortification of micronutrients in this crop. Romero-Dávila *et al.* (2018) measured the total concentrations of P, S, Cl, K, and Ca with PIXE (1.7 MeV) in fortified cereals consumed in Mexico and Fe, Cu, Mn, and Zn with X-ray fluorescence (XRF, 35 kV). They used reference materials for quality control and a certified fortified cereal material to verify analytical accuracy and reported the overestimation of some content of these elements on cereal labels.

PIXE can combine with other techniques, such as the Rutherford elastic backscatter spectrometry (RBS), particle-induced gamma-ray emission (PIGE) (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Kuisma-Kursula (2000) combined PIXE with X-rays (WDXRF, Wavelength dispersive X-ray fluorescence;

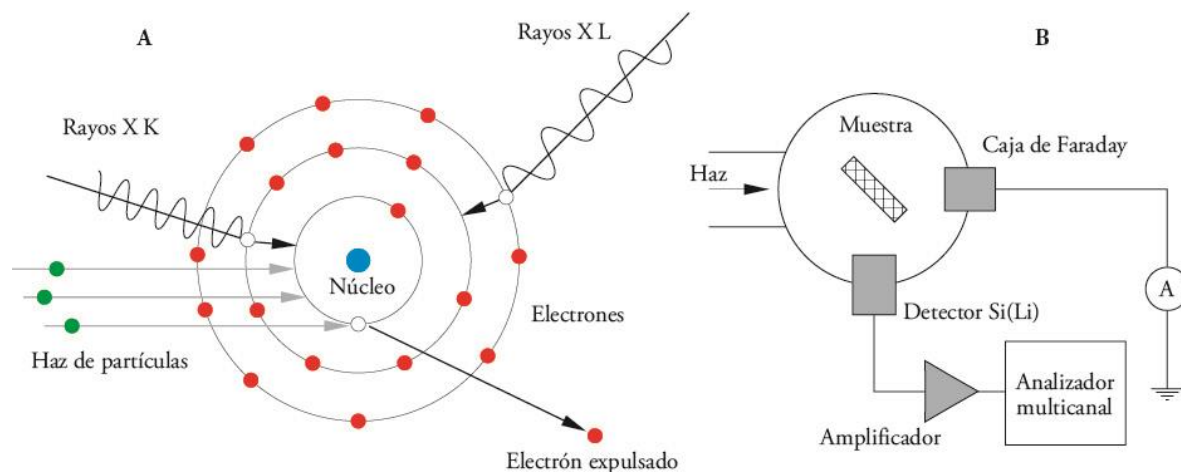


Figura 3. A) Emisión de electrones por PIXE. B) Componentes de un espectrómetro PIXE.
Figure 3. A) Electron emission by PIXE. B) Components of a PIXE spectrometer.

der Ent *et al.*, 2018) y para elementos pesados hasta 10 MeV (Ruvalcaba, 2013). La eficiencia del detector es más alta si la energía aplicada es de 5 a 25 eV. En parte, esto determina las series de emisión de rayos X usados para el análisis de elementos según su número atómico (Z). La técnica PIXE permite analizar con mayor exactitud elementos con Z entre 18 y 40 (van der Ent *et al.*, 2018). En PIXE no se pueden analizar elementos ligeros como Na, Al, Mg y Si (Kuisma-Kursula, 2000), de interés en estudios de vegetales y suelos. Los equipos PIXE están en laboratorios de física nuclear y su uso no es para fines de análisis rutinario, debido a que el aparato incluye un acelerador de partículas. No obstante, la versión micro de PIXE es una técnica usada con mayor frecuencia y cada vez presenta nuevas aplicaciones (Johansson *et al.*, 1995; Grieken, 2004).

La espectrometría PIXE en su inicio se usó para analizar elementos traza en hojas delgadas en semiconductores. Luego se modificaron los porta muestras para introducir y analizar materiales geológicos, arqueológicos, forenses y objetos artísticos donde es importante no alterar la muestra, y no requiere vacío. Esta técnica se usa para analizar esos materiales porque es sensible, rápida (Johansson *et al.*, 1995) y también puede complementarse con otras técnicas. Las aplicaciones para el estudio de procesos fisiológicos en plantas vivas se desarrollaron después (van der Ent *et al.*, 2018).

Mesjasz-Przybyłowicz y Przybyłowicz (2002) usaron micro-PIXE para estudiar en plantas procesos fisiológicos a nivel celular, y determinaron nutrientes esenciales y elementos tóxicos. Micro-PIXE es una técnica de análisis de microsonda que consiste en aplicar el haz estable y enfocado de protones sobre micro muestras o micro áreas de especímenes más grandes. Las microsondas usan microscopios ópticos modificados para ubicar el área a analizar, dirigir el haz de la sonda y recoger la señal analítica. Con este procedimiento se obtienen imágenes de una y dos dimensiones de la distribución de elementos químicos en la muestra. Micro-PIXE tiene potencial para estudiar la distribución de elementos químicos en diversos materiales y para vegetales de interés en este ensayo. El progreso en la aplicación de esta técnica estará sujeto, en parte, a una colaboración más estrecha entre los biólogos que investigan las plantas y la comunidad de los estudiosos de PIXE para abordar los problemas de: preparación de muestras, refinamiento de

and EDXRF, Energy dispersive X-ray fluorescence) to determine macro, micro and trace elements in old glass. The detection limits of EDXRF, WDXRF, and PIXE for that materials were 0.1, 0.01, and 1 to 10 mg kg⁻¹, respectively.

X-ray fluorescence spectrometry (XRF)

The basis of X-ray fluorescence is the fluorescence emissions generated by the excitation of the atoms in a sample using an X-ray source. X-rays (primary radiation) affect the internal electrons of the atoms that make up the sample (Fernández-Ruiz, 2008), and an electron of the internal layers is delocalized. Another electron of a more external level occupies the vacancy and emits an X-ray (secondary radiation) photon characteristic of the atom from which it comes (Goldstein *et al.*, 1981; Fernández-Ruiz, 2008). The energy of the emitted X-ray photon (E_{photon}) is equal to the energy difference of the states of higher (E_i) and lower energy (E_j). Another more external electron fills the new vacancy generated in the outer layer, with the emission of a new photon of lower energy. This process continues occurring until a free-electron occupies the last vacancy of the valence electron and the atom returns to its state of minimum energy (Figure 4). Because the energy states of electrons are quantized and distinctive of each element, the emitted (secondary) X-ray photons are characteristic of the atoms that generate them. The radiation that comes from all the photons emitted from the K, L, or even M layers (Ruvalcaba, 2013), generates an X-ray spectrum (Towett *et al.*, 2016). A spectrometer measures the intensity or energy of the spectral lines (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

The XRF spectrometers classify into two categories according to the method used to separate energies from emitted radiation. The energy dispersion spectrometer (EDXF or EDXRF) uses a solid-state detector that separates the energies without any mechanical movement. The wavelength dispersion spectrometer (WDXF or WDXRF) uses a glass grid to separate energies and a conventional X-ray detector measures the intensities. The EDXRF spectrometer is fast and, in general, has lower sensitivity and resolution than the WDXRF spectrometer (Sanjeeva and Reidinger, 1996; Guerra *et al.*, 2014; Margui *et al.*, 2011). The essential components of the EDXRF and WDXRF spectrometers are an ultra-high vacuum chamber, a primary radiation source, a

los protocolos analíticos, principalmente en el mapeo elemental cuantitativo e interpretación de resultados. El presente ensayo busca potenciar este tipo de interacciones.

Como ejemplo de lo anterior, Cvitanich *et al.* (2010) usaron ICP y PIXE para estudiar la acumulación de Fe y la ferritina en la testa y el cotiledón de semillas de *Phaseolus*. Estos estudios son útiles en la biofortificación de micronutrientes en este cultivo. Romero-Dávila *et al.* (2018) midieron las concentraciones totales de P, S, Cl, K y Ca con PIXE (1.7 MeV) en cereales fortificados consumidos en México y con fluorescencia de rayos X (XRF, 35 kV) Fe, Cu, Mn y Zn. Ellos usaron materiales de referencia para el control de calidad y un material certificado de cereal fortificado para verificar la precisión analítica, y reportaron sobreestimación en algunos contenidos de estos elementos en las etiquetas de los cereales.

PIXE puede combinarse con otras técnicas, como la espectrometría de retrodispersión elástica de Rutherford (RBS, Rutherford backscattering spectrometry), la emisión de rayos gama inducida por partículas (PIGE, Particle-induced gamma emission) (Ruvalcaba, 2013; van der Ent *et al.*, 2018). Kuisma-Kursula (2000) combinó PIXE con rayos X (WDXRF, Wavelength dispersive X-ray fluorescence; y EDXRF, Energy dispersive X-ray fluorescence) para determinar macro, micro y elementos traza en vidrio antiguo. Los límites de detección de EDXRF, WDXRF y PIXE para ese estudio fueron 0.1, 0.01 y 1 a 10 mg kg⁻¹.

Espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF)

La base de la fluorescencia de rayos X son las emisiones de fluorescencia generadas por la excitación de los átomos de una muestra mediante una fuente de rayos X. Los rayos X (radiación primaria) inciden sobre los electrones internos de los átomos que componen la muestra (Fernández-Ruiz, 2008) y un electrón de las capas internas es deslocalizado. Otro electrón de un nivel más externo ocupa la vacante y emite un fotón de rayos X (radiación secundaria) característico del átomo del que procede (Goldstein *et al.*, 1981; Fernández-Ruiz, 2008). La energía del fotón de rayos X (radiación secundaria) emitido ($E_{\text{fotón}}$) es igual a la diferencia energética de los estados de mayor (E_i) y menor energía (E_f). La nueva vacante generada en la

photon analyzer, a detector, and a quantifier (Figure 5). The primary radiation comes from an X-ray tube, and sometimes a synchrotron (a particular type of cyclic particle accelerator) or a radioactive material (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016) is used. An X-ray tube with an anode of Rh, Ag, Mo, Cr, or W emits the photons. The detector is a solid-state cooled by a Peltier current. Secondary photons are identified as counts and are converted by a computer into an energy spectrum, where the peaks correspond to the elements to be quantified (Towett *et al.*, 2016).

The XRF spectrometers can be of two types: field or laboratory (Towett *et al.*, 2016). The EDXRF mode is more used in portable or field equipment, but it can also be used in laboratory equipment, while WDXRF is more frequent in the latter (Kouichi *et al.*, 2004; van der Ent *et al.*, 2018). Portable devices are faster to assess the composition of samples and are less expensive, although the detection limits are lower than those of laboratory equipment. The WDXRF technique is more expensive than EDXRF.

The XRF is used for performing microanalysis (micro-XRF) and elementary mapping, for which the detectors require optical systems, as well as, exact displacement systems, to make surface sweeps with the spatial resolution of nanometers. *Ad hoc* procedures are necessary to study the distribution of elements with micro-XRF, to prepare the sample and to preserve the sample in its natural state. The cost of this microanalysis and mapping equipment is higher than the other configurations of XRF equipment (Ruvalcaba, 2013).

The limitation of the XRF techniques is the interference coming from the matrix of the materials. Therefore, to know the chemical elements of the sample references similar to the latter are necessary for calibration purposes (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). It is possible to analyze powders, pellets, films, fibers or pieces of material, as well as liquids and suspended solids. For quantitative analysis, the sample preparation is minimal and must be finely ground to ensure homogeneity (Sanjeeva and Reidinger, 1996). It is the case of samples of plant material that Towett *et al.* (2016) studied with XRF equipment: direct analysis or with sample protection, application of vacuum or not, use of different plant matrices.

The XRF is a non-destructive surface spectrometry suitable for qualitative and quantitative multi-

capa externa puede rellenarse por otro electrón más externo, un nuevo fotón de menor energía es emitido y los electrones ocupan los espacios energéticos vacíos de acuerdo con la teoría cuántica. Este proceso se produce sucesivamente hasta que un electrón libre ocupa la última vacante del electrón de valencia y el átomo regresa a su estado de mínima energía (Figura 4). Debido a que los estados de energía de los electrones están cuantizados y son característicos de cada elemento, los fotones de rayos X (secundarios) emitidos son característicos de los átomos que los generan. La radiación que proviene de todos los fotones emitidos procedentes de las capas K, L o incluso M (Ruvalcaba, 2013) generan un espectro de rayos X (Towett *et al.*, 2016). La intensidad o la energía de las líneas espectrales se miden con un espectrómetro (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

Los espectrómetros de XRF se clasifican en dos categorías según el método usado para separar las energías de las radiaciones emitidas. El espectrómetro de dispersión de energía (EDXF o EDXRF) usa un detector de estado sólido que separa las energías sin ningún movimiento mecánico. El espectrómetro de dispersión de longitud de onda (WDXF o WDXRF) utiliza una rejilla de cristal para separar las energías y las intensidades se miden mediante un detector de rayos X convencional. El espectrómetro EDXRF es más rápido y, en general, tiene menor sensibilidad y resolución que el espectrómetro WDXRF (Sanjeeva and Reidinger, 1996; Guerra *et al.*, 2014; Margui *et al.*, 2011). Los componentes básicos

element analysis in plants. In studies of pollution, agriculture, forestry, element chemistry of medicinal plants, and their extracts, XRF is used (Queralt *et al.*, 2005; Margui *et al.*, 2011; Tezotto *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2015). Dumlapinara *et al.* (2007) used WDXRF to measure P, K, Ca, Mg, Cl, S, Cu in bean seedlings subjected to cold stress for the study of nastics movements, whereas Margui *et al.* (2011) studied the dispersion of metals in mining areas with EDXR and WDXRF to determine macro, micro and trace elements in bioindicators plant species.

Tezotto *et al.* (2013) used EDXRF to measure Ni and Zn in coffee leaves; the concentrations measured were higher than those obtained with ICP, and their cost was lower. Sosa *et al.* (2018) evaluated concentrations of Fe (30 clones) and Zn (12 clones) with this same technique in potato breeding studies. The comparison of P, K, Ca, S, Fe, Mn, and Si in sugarcane measured with portable and laboratory EDXRF devices showed a close correlation ($P > 0.9$) (Guerra *et al.*, 2014). De Carvalho *et al.* (2018) diagnosed the nutritional status in vegetables, in solid samples, with the combination of XRF, ICP-MS, and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), and created protocols for the use of XRF in direct analyzes in the field. Guerra *et al.* (2015) analyzed *in situ* P, K, Ca, S, Fe, Mn, and Si on sugarcane leaves directly in the field by using EDXRF and LIBS.

Although XRF applications are increasingly frequent in plant analysis, detection and quantification processes must be optimized to make this technique as reliable as conventional techniques. Calibration

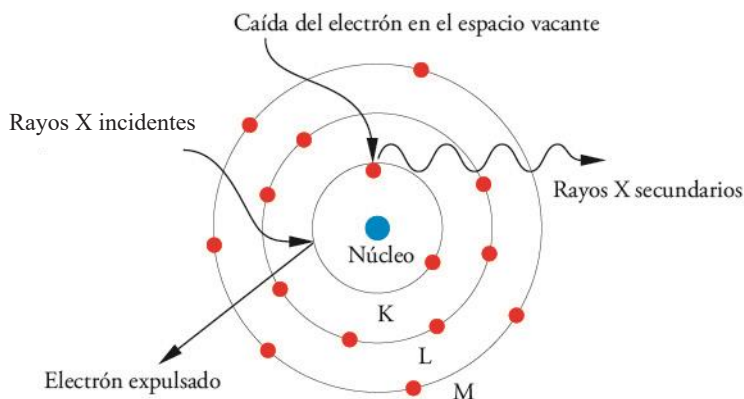


Figura 4. Esquema de la emisión de fotones en XRF (Fundamento de fluorescencia de rayos X en imágenes. s.f. <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif>).

Figure 4. Scheme of the emission of photons in XRF (Foundation of X-ray fluorescence in images <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif>).

de los espectrómetros EDXRF y WDXRF son una cámara de ultra alto vacío, una fuente de radiación primaria, un analizador de fotones, un detector y un cuantificador (Figura 5). La radiación primaria procede de un tubo de rayos X, aunque también puede usarse un sincrotrón (tipo particular de acelerador cíclico de partículas) o un material radioactivo (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). Para emitir los fotones (radiación primaria) se usa un tubo de rayos X con ánodo de Rh, Ag, Mo, Cr o W. El detector es de estado sólido refrigerado por una corriente de Peltier. Los fotones secundarios son identificados como cuentas y son convertidos por una computadora en un espectro de energía, donde los picos corresponden a los elementos que se quiere cuantificar (Towett *et al.*, 2016).

Los espectrómetros de XRF pueden ser de campo o de laboratorio (Towett *et al.*, 2016). La modalidad EDXRF es más usado en equipos portátiles o de campo, aunque también se puede usar en equipos de laboratorios, mientras que WDXRF es más frecuente en estos últimos (Kouichi *et al.*, 2004; van der Ent *et al.*, 2018). Los dispositivos portátiles son más rápidos para evaluar la composición de las muestras y su costo es menor, aunque los límites de detección son inferiores a los de equipos de laboratorio.

with matrix standards coinciding with those of the analyzed samples is still a critical problem that must be solved (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018; Sawisza *et al.*, 2011). In soils, this technique is used in combination with the ICP-MS to analyze heavy elements in low concentrations since their detection limits are parts per million.

X-ray dispersive energy spectrometry (EDS) and dispersive wavelength (WDS)

The EDS spectrometry, also called EDX, is a non-destructive surface technique for qualitative and quantitative multi-element analysis of a wide variety of materials and plants. Its fundamental principle is the dispersive energy of X-rays. The XRF spectrometers couple to scanning electron microscopes (SEM) or transmission electron microscopy (TEM) or a combination of both (STEM, Scanning transmission electron microscopy). This equipment allows obtaining the concentration of chemical elements, and high-resolution images. These techniques correspond to X-ray fluorescence microscopy (XFM) (van der Ent *et al.*, 2018).

The general components of EDS spectrometers are a source of electrons, an X-ray detector, and a pulse processor-analyzer. The detector converts X-ray energy to voltage and this information is sent to a

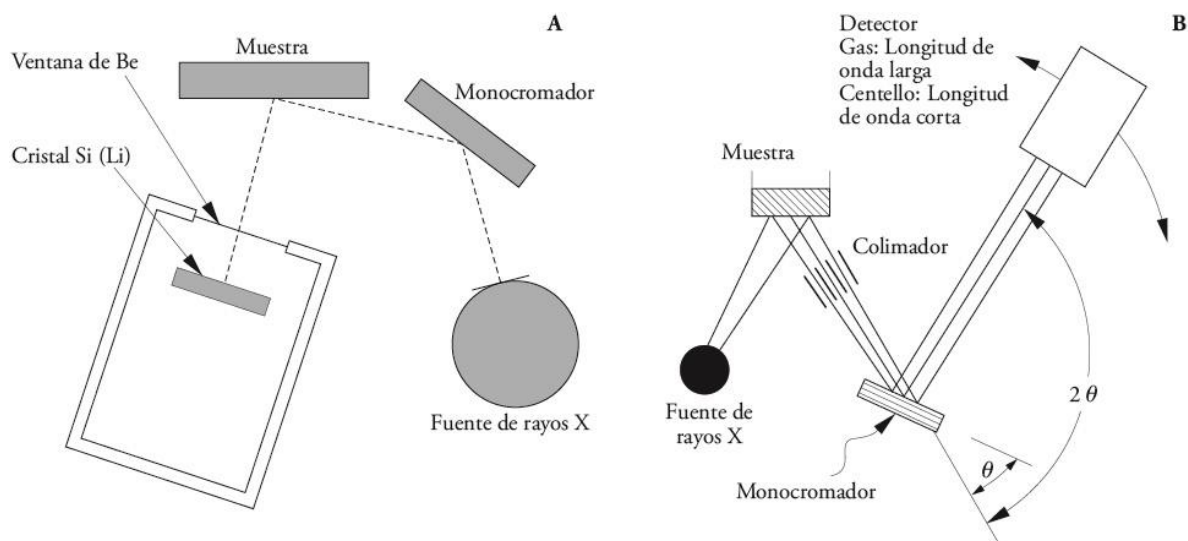


Figura 5. Espectrofotómetros EDXRF (A) y WDXRF (B) (Sanjeeva and Reidinger, 1996).
Figure 5. EDXRF (A) and WDXRF (B) spectrophotometers (Sanjeeva and Reidinger, 1996).

WDXRF es una técnica más costosa que EDXRF.

La XRF permite hacer microanálisis (micro-XRF) y mapeos elementales, para lo cual los detectores requieren sistemas ópticos, así como sistemas de desplazamiento muy precisos para hacer los barridos de superficie con resolución espacial del orden de nanómetros. Para estudiar la distribución de elementos con micro-XRF se usan procedimientos *ad hoc* para preparar la muestra y preservar su estado natural. El costo de estos equipos de microanálisis y de hacer mapeo es mayor al de las otras configuraciones de equipos de fluorescencia de rayos X (Ruvalcaba, 2013).

La limitante de las técnicas XRF son las interferencias provenientes de la matriz de los materiales. Por lo cual, para conocer los elementos químicos de la muestra se requieren referencias similares a ésta para calibrar (Goldstein *et al.*, 1981; Towett *et al.*, 2016). Es posible analizar polvos, pellets, películas, fibras o trozos de material, así como líquidos y sólidos en suspensión. Para el análisis cuantitativo la preparación de las muestras es mínima y se muelen muy fino para asegurar la homogeneidad (Sanjeeva y Reidinger, 1996). Este es el caso de muestras de material vegetal que Towett *et al.* (2016) estudiaron con equipos XRF: análisis directo o con protección de la muestra, aplicación o no de vacío, uso de diferentes matrices vegetales.

La XRF es una espectrometría de superficie, no destructiva, apropiada para el análisis cualitativo y cuantitativo multielemental en vegetales. Se usa en estudios de contaminación, agricultura, forestería, química elemental de plantas medicinales y sus extractos (Queralt *et al.*, 2005; Margui *et al.*, 2011; Tezotto *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2015). Dumlupinara *et al.* (2007) usaron WDXRF para medir P, K, Ca, Mg, Cl, S, Cu en plántulas de frijol sometidas a estrés de frío para el estudio de movimientos násticos, mientras que Margui *et al.* (2011) estudiaron la dispersión de metales en áreas mineras con EDXR y WDXRF para determinar elementos macro, micro y trazas en especies vegetales utilizadas como bioindicadores.

Tezotto *et al.* (2013) usaron EDXRF para medir Ni y Zn en hojas de café; las concentraciones medidas fueron más altas que las obtenidas con ICP y su costo fue menor. Sosa *et al.* (2018) evaluaron concentraciones

pulse processor that measures them. Each pulse corresponds to a current proportional to the energy of the X-ray that arrives. The current is amplified and stored according to its amplitude by a multichannel analyzer. After “counting” a sufficient number of X-rays, the output of the multichannel constitutes the X-ray spectrum of the sample (Zavaleta-Mancera and Arenas-Alatorre, 2013). The new systems have a solid-state *silicon drift detector* or SDD devices (Towett *et al.*, 2016). The accuracy of the EDS spectra can be affected by the overlapping of peaks (for example, Ti-K and V-K, Mn-K and Fe-K), the nature of the sample and the generation of X-rays by other atoms of the sample excited by the radiation beam (Goldstein *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 2018).

The concentrations of the chemical elements to be quantified must be at least 100 mg kg⁻¹ (Zavaleta-Mancera and Arenas-Alatorre, 2013), but lower concentrations can be measured with a modification of the working conditions of the equipment. According to the last authors mentioned, this technique is fast, as low as 3 min in modern equipment, and gives information about the relative abundance of chemical elements with atomic numbers higher than Na (Z=11).

To measure elements with the atomic number from 40 to 80 with EDS, a potential of 10 to 40 KeV is required. The detection limits of the most massive elements with EDS are low (especially at concentrations <100 mg g⁻¹), and the depth of analysis is less than 2 mm (Ruvalcaba, 2013). This technique may be used to obtain heavy element mapping with low or medium vacuums. Modi *et al.* (2004) compared measurements made with EDS and AAS in *Phaseolus vulgaris* seeds. The first one overestimated the concentration of Ca, but those results can be useful in semi-quantitative studies. The EDS coupled to SEM/TEM microscopes was used by van der Ent *et al.* (2018) to study homeostasis of hyper accumulative plants and the coordination of metals in plant tissues.

The configuration WDS coupled to microscopes (Figure 6) (Tanaka *et al.*, 2008) has a higher spectral resolution than EDS, and avoids the problems of false peaks and noise of amplifiers associated with EDS. However, WDS has a low sensitivity to measure elements with atomic numbers less than Na (Z=11) and trace elements (Goldstein *et al.*, 2018). WDS detection limits are 0.01% by weight (Kuisma-Kursula, 2000).

de Fe (30 clones) y Zn (12 clones) con esta misma técnica en estudios de fitomejoramiento de papa. La comparación de P, K, Ca, S, Fe, Mn y Si en caña de azúcar medidos con dispositivos EDXRF portátiles y de laboratorio mostró una correlación estrecha ($P > 0.9$) (Guerra *et al.*, 2014). De Carvalho *et al.* (2018) diagnosticaron el estado nutricional en vegetales en muestras sólidas, con la combinación de XRF, ICP-MS y la ruptura inducida por láser (LIBS, laser-induced breakdown spectroscopy), y crearon protocolos para el uso de XRF en análisis directos en el campo. Guerra *et al.* (2015) analizaron *in situ* P, K, Ca, S, Fe, Mn y Si directo en campo en las hojas de caña de azúcar por EDXRF y LIBS.

Aunque las aplicaciones de XRF son cada vez más frecuentes en el análisis vegetal, se debe optimizar los procesos de detección y cuantificación para que esta técnica sea tan confiable como las técnicas convencionales. La calibración con estándares de matrices coincidente con las de las muestras analizadas es un problema crítico todavía y debe ser resuelto (de Carvalho *et al.*, 2018; Romero-Dávila *et al.*, 2018; Sawisza *et al.*, 2011). En suelos esta técnica se usa en combinación con ICP-MS para analizar elementos pesados en bajas concentraciones ya que sus límites de detección son de partes por millón.

Espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) y de longitud de onda dispersiva (WDS)

La espectrometría EDS, también llamada EDX, es una técnica de superficie no destructiva para el análisis cualitativo y cuantitativo multielemental de una amplia variedad de materiales y de plantas. Su principio fundamental es la energía dispersiva de rayos X. Los espectrómetros XRF se acoplan a microscopios electrónicos de barrido (SEM, Scanning electron microscopy) o de transmisión (TEM, Transmission electron microscopy) o a una combinación de ambos (STEM, Scanning transmission electron microscopy). Con estos equipos se obtiene la concentración de elementos químicos y se adquieren imágenes de alta resolución. Estas técnicas corresponden a microscopía de fluorescencia de rayos X (XFM, X-ray fluorescence microscopy) (van der Ent *et al.*, 2018).

Los componentes generales de los espectrómetros EDS son una fuente de electrones, un

Queralt *et al.* (2005) proposed a protocol to control the nutritional quality of medicinal plants *in situ* to analyze P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si, and Ti using WDS, and of Fe, Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr, and Pb with EDS (mg kg^{-1} in both cases). The protocol included measuring in infusions of these plants P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si, and Fe with ICP, and Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr, and Pb with ICP-MS (mg L^{-1} in both cases). The combination of these techniques performed well to classify these medicinal plants for nutrient supply purposes.

Final comments

The techniques ICP, ICP-MS, XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS and WDS, are used to make multi-element analysis of total contents of elements present in plant and soil samples, including those essential for plant growth and some toxic elements. In contrast, conventional AES and AAS spectrometry are for non-simultaneous analysis of these elements. A disadvantage of ICP-MS, ICP, AES, and AAS is that they require samples solubilization. In the case of XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS and WDS, no solubilization or physical processing of the samples is necessary, and the analysis is punctual, so it does not include the average value of the sample. The XPS technique allows the analysis of ionic fractions for studies of the oxidation states of the elements. ICP-MS, XRF are versatile and have similar levels of sensitivity. PIXE, EDS, WDS need that the base instrument be coupled to a microscope, and the samples require an *ad hoc* preparation. The most frequent use of XRF is to make measurements *in situ* of total elements in vegetables and living tissues. In turn, PIXE has more restricted applications for routine elementary plant analysis, and EDS and WDS are useful in the morphological study of plant surfaces.

The methodologies analyzed in this essay provide complementary information to conventional techniques and describe its basic principles; however, the use of these non-conventional technique is scarce in the agronomic field. This essay aims to contribute to diffusion of the potential of these methodologies among professionals and researchers of plant nutrition, food quality, and the environment.

—End of the English version—



detector de rayos X y un procesador-analizador de pulsos. El detector convierte la energía de los rayos X a voltaje y esta información se envía a un procesador de pulsos que las mide. A cada pulso le corresponde una corriente proporcional a la energía del rayo X que llega. La corriente se amplifica y almacena de acuerdo con su amplitud por un analizador multicanal. Después del “conteo” de un número suficiente de rayos X, la salida del multicanal constituye el espectro de rayos X de la muestra (Zavaleta-Mancera y Arenas-Alatorre, 2013). Los nuevos sistemas están equipados con dispositivos de estado sólido tipo *silicon drift detector* o SDD (Towett *et al.*, 2016). La precisión de los espectros EDS puede ser afectada por: sobrelapamiento de picos (por ejemplo, Ti-K y V-K, Mn-K y Fe-K), la naturaleza de la muestra y la generación de rayos X por otros átomos de la muestra excitados por el haz de radiación (Goldstein *et al.*, 1981; Goldstein *et al.*, 2018).

Las concentraciones de los elementos químicos a cuantificar deben ser al menos 100 mg kg⁻¹ (Zavaleta-Mancera y Arenas-Alatorre, 2013) y concentraciones menores se pueden medir con una modificación de las condiciones de trabajo del equipo. Según los últimos autores mencionados, esta técnica es rápida, 3 min en equipos recientes, y da información de la abundancia relativa de elementos químicos con número atómico mayor al Na (Z=11).

Para medir elementos con número atómico de 40 a 80 con EDS, se requiere un potencial de 10 a 40 KeV. Los límites de detección de los elementos más pesados con EDS es baja (sobre todo a concentraciones <100 mg g⁻¹) y la profundidad de análisis es menor a 2 mm (Ruvalcaba, 2013). Esta técnica se puede usar para obtener mapeos de elementos pesados con vacíos bajos o medios. Modi *et al.* (2004) compararon mediciones hechas con EDS y AAS para analizar semillas de *Phaseolus vulgaris*. La primera de ellas sobreestimó la concentración de Ca, pero esos resultados se pueden usar en estudios semicuantitativos. La EDS acoplada a microscopios SEM/TEM se usó por van der Ent *et al.* (2018) para estudiar la homeostasis de plantas hiperacumuladoras y la coordinación de metales en los tejidos vegetales.

La configuración WDS acoplada a microscopios (Figura 6) (Tanaka *et al.*, 2008) presenta una mayor resolución espectral que EDS, evita los problemas de picos falsos y ruido de los amplificadores asociados con EDS. Pero WDS tiene una baja sensibilidad para medir elementos con número atómico menor al Na (Z=11) y elementos traza (Goldstein *et al.*, 2018). Los límites de detección de WDS son 0.01% en peso (Kuisma-Kursula, 2000).

Queralt *et al.* (2005) propusieron un protocolo para controlar la calidad nutrimental de plantas medicinales *in situ* con el análisis de P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si y Ti con WDS, y de Fe, Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr y Pb con EDS (mg kg⁻¹ en ambos casos). El protocolo incluyó medir en infusiones de estas plantas P, S, K, Ca, Mg, Na, Al, Si y Fe con ICP, y de Cu, Mn, Zn, As, Rb, Sr y Pb con ICP-MS (mg L⁻¹ en ambos casos). La combinación de estas técnicas tuvo un buen desempeño para la clasificación nutrimental de estas plantas medicinales.

Comentarios finales

ICP, ICP-MS, XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS y WDS se emplean para hacer análisis multielemental de contenidos totales de elementos presentes en muestras vegetales y de suelos, entre ellos, los esenciales para el crecimiento de los vegetales y algunos tóxicos. En contraste, las espectrometrías convencionales AES y AAS son para realizar análisis no simultáneos de estos elementos. Una desventaja de ICP-MS, ICP, AES y AAS es que demandan la solubilización de las muestras. En el caso de XPS, PIXE, XRF (EDXRF, WDXRF), EDS y WDS no se requiere solubilización ni procesamiento físico de las muestras y el análisis es puntual, por lo cual no comprende el valor medio de la muestra. La técnica XPS permite el análisis de fracciones iónicas para estudios de los estados de oxidación de los elementos. ICP-MS, XRF son versátiles y poseen niveles similares de sensibilidad. Las técnicas PIXE, EDS, WDS necesitan que el instrumento base se acople a un microscopio y las muestras requieren una preparación *ad hoc*. El uso más frecuente de XRF es para hacer mediciones *in situ* de elementos totales en vegetales y tejidos vivos. Por su parte, PIXE tiene aplicaciones más restringidas para el análisis elemental rutinario de vegetales, y EDS y WDS son útiles en el estudio morfológico de la superficie de las plantas.

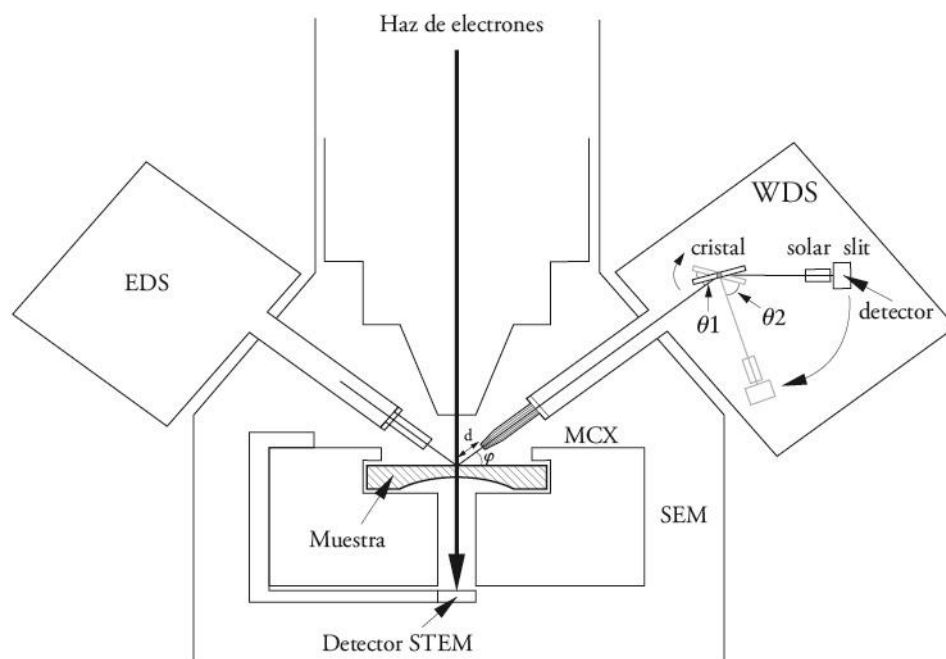


Figura 6. Esquema de un Sistema STEM-WDS (Tanaka *et al.*, 2008).

Figure 6. Scheme of a STEM-WDS System (Tanaka *et al.*, 2008).

Las metodologías discutidas en este ensayo proporcionan información complementaria a las técnicas convencionales y describen sus principios básicos, pero el uso de estas técnicas no convencionales es escaso en el ámbito agronómico. El presente ensayo es una contribución a la difusión de la potencialidad de esas técnicas entre los profesionales e investigadores de la nutrición de las plantas, la calidad de los alimentos y el medioambiente.

LITERATURA CITADA

- Abián, J., M. Carrascal, y M. Gay M. 2008. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. *Proteómica* 2: 16-64.
- Barr, T. L., E. E. Hoppe, S. Hardcastle, and S. Seal. 1999. X-ray photoelectron spectroscopy investigations of the chemistries of soils. *J. Vac. Sci. Technol. A* 17: 1079-1085.
- Caughlin, B.L. 2010. Developments in analytical technology. *Geochem-Explor. Env. A* 10: 137-141.
- Chirinos J., D. Oropeza, J. González, V. Zorba, and R. E. Russo. 2017. Analysis of plant leaves using laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry: use of carbon to compensate for matrix effects. *Appl. Spectrosc.* 7: 709-720.
- Cvitanich, C., W. J. Przybylowicz, D. F. Urbanski, A. M. Jurkiewicz, J. Mesjasz-Przybylowicz, M. W. Blair, C. Astudillo, E. O. Jensen, and J. Stougaard. 2010. Iron and ferritin accumulate in separate cellular locations in *Phaseolus* seeds. *BMC Plant Biol.* 10: 26 p.
- de Carvalho, G. G. A., M. B. B. Guerra, A. Adame, C. S. Nomura, P. V. Oliveira, H. W. P. de Carvalho, D. S. Júnior, L. C. Nunes, and F. J. Krug. 2018. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. (Review). *J. Anal. Atom. Spectrom.* 33: 919-944.
- Dumlupinar, R., F. Demir, G. Budak, A. Karabulut, N. Kadi, H. Karakurt, and S. Erdal. 2007. Determination of replacement of some inorganic elements in pulvinus of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Gina 2004) at chilling temperature by the WDXRF spectroscopic technique. *J. Quant. Spectrosc. Ra.* 103: 331-339.
- Fadley, C. S. 2010. X-ray photoelectron spectroscopy: Progress and perspectives. *J. Electron. Spectrosc.* 178-179: 2-32.
- Fernández-Ruiz, R. 2008. Seminarios. La espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF). <http://ramontxrf.260mb.net/icpms.html>. (Consulta: junio 2018).
- Fundamento de fluorescencia de rayos X en imágenes. <https://helioza.com/wp-content/uploads/2015/07/xrf-principle-300x232.gif> (Acceso: julio 2019).
- Guelke, S., and F. von Blanckenburg. 2012. Fe isotope fractionation caused by translocation of iron during growth of bean and oat as models of strategy I and II plants. *Plant Soil* 352: 217-231.

- Grieken, R. Van. 2004. Considering the role of X-ray spectrometry in chemical analysis and outlining the volume. *In*: Tsuji, K., J. Inuk and R. V. Grieken (eds). X-ray Spectrometry: Recent Technological Advances. John Wiley and Sons, Ltd. pp: 1-11.
- Guerra M., B. B., E. de Almeida, G. G. A. Carvalho, P. F. Souza, L. C. Nunes, D. S. Júnior, and F. J. Krug. 2014. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 29: 1667-1674.
- Guerra, M. B. B., A. Adame, E. de Almeida, G. G. A. de Carvalho, D. Santos Jr., and V. Krug. 2015. Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 30: 1646-1654.
- Goldstein, J. I., D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. Ritchie, J. H. J. Scott, and D. C. Joy. 2018. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *In*: Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. Fourth Edition. Springer. New York, NY, USA. pp: 65-92.
- Hofmann, S. 2012. Auger-and X-ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science: A User-oriented Guide. Springer Science & Business Media. Vol. 49.
- Johansson, S. A. E., J. L. Campbell, and K. G. Malmqvist. 1995. Particle-induced X-Ray emission spectrometry (PIXE). https://books.google.com.mx/booksid=zKgFMQrfiIH8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (Acceso: julio 2019).
- Kuisma-Kursula, P. 2000. Accuracy, precision and detection limits of SEM-WDS, SEM-EDS and PIXE in the multi-elemental analysis of medieval glass. *X-Ray Spectrom.* 29: 111-118.
- Masson P., T. Dalix, and S. Bussière. 2010. Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 41: 231-243.
- Mesjasz-Przybyłowicz, J., and W. J. Przybyłowicz. 2002. Beam interaction with material and atoms. Micro-PIXE in plant sciences: present status and perspectives. *Nucl. Instrum. Meth B.* 189: 470-481.
- Metzner R., H. U. Schneider, U. Breuer, and W. H. Schroeder. 2008. Imaging nutrient distributions in plant tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy. *Plant Physiol.* 147: 1774-1787.
- Modi, A. T., T. A. Kjonstad, B. J. White, and P. Berjak. 2004. Comparison of EDX and AA to determine distribution of Ca²⁺ in *Phaseolus vulgaris* (L) seed parts following osmopriming. *S. Afr. J. Bot.* 70: 298-302.
- Queral, I., M. Ovejero, M. L. Carvalho, A. F. Marques, and J. M. Llabres. 2005. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques *X-Ray Spectrom.* 34: 213-217. DOI: 10.1002/xrs.795.
- Reyes-Moreno, C., O. Paredes-López, and E. González. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans —A review. *Crit. Rev. Food Sci.* 33: 227-286.
- Romero-Dávila, E., J. Miranda, O. G. de Lucio, and J. C. Pineda. 2018. PIXE and XRF elemental analysis of breakfast cereals consumed in Mexico. *J. Radioanal. Nucl. CH.* 318: 887-895.
- Rubinson, A. K., and J. F. Robinson. 2001. Análisis Instrumental. Pearson Educación, S. A., Madrid. España. Editor. Isabel Capella. 839 p.
- Ruvalcaba S. J. L. 2013. Métodos analíticos para la determinación metales orgánicos. *In*: Alarcón A., y R. Ferrera-Cerrato (eds). Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas con Compuestos Orgánicos e Inorgánicos. Primera edición. Trillas. México. pp: 279-304.
- Sanjeeva, N. M., and F. Reidinger. 1996. *In*: Sibilia, J. P. (ed). A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis. John Wiley & Sons. pp: 143-164.
- Sedgwick, R. D., and D. M. Hindenlang. 1996. Mass spectrometry. *In*: Sibilia, J. P. (ed). A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis. John Wiley & Sons. Pp: 61-82.
- Soltanpour, P. N., G. W. Johnson, S. M. Workman, J. Benton J, Jr., and R. O. Miller. 1996. Inductively coupled plasma emission spectrometry and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *In*: Sparks, D. L. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods. SSSA. Book Series No. 5. pp: 91-140.
- Sosa P., G. Guild, G. Burgos, M. Bonierbale, and T. Zum Felder. 2018. Potential and application of X-ray fluorescence spectrometry to estimate iron and zinc concentration in potato tubers. *J. Food Compos. Anal.* 70: 22-27.
- Tanaka, M., M. Takeguchi, and K. Furuya. 2008. X-ray analysis and mapping by wavelength dispersive X-ray spectroscopy in an electron microscope. *Ultramicroscopy.* 108: 1427-1431.
- Thyssen, G. M., C. Keil, M. Wolff, M. Sperling, D. Kadow, H. Haase, and U. Karst. 2018. Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 33: 187-194.
- Tezotto, T., J. L. Favarin, A. P. Neto, P. L. Gratao., R. A. Azevedo, and P. Mazzafera. 2013. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). *Sci. Agric.* 70: 263-267.
- Towett E. K., K. D. Shepherd, and B. Lee. Drake. 2016. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXPF) spectroscopy: quantification under different, analytical parameters. *X-ray Spectrom.* 45:117-124.
- van der Ent, A., W. J. Przybyłowicz, M. D. de Jonge, H. H. Harris, C. G. Ryan, G. Tylko, D. J. Paterson, A. D. Barnabas, P. M. Kopittke, and J. Mesjasz-Przybyłowicz. 2018. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants (Review). *New Phytol.* 218: 432-452.
- Vempati R. K., T. R. Hess, and D. L. Cocke. 1996. X ray photoelectron spectroscopy. *In*: Sparks, D. L. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical methods. SSSA. Book Series No. 5. pp: 357-376.
- Zavaleta-Mancera, H. A., y J. A. Arenas-Alatorre. 2013. Microscopía electrónica y detección de metales pesados en estudios de biorremediación. *In*: Alarcón A., y R. Ferrera-Cerrato (eds). Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas con Compuestos Orgánicos e Inorgánicos. Primera edición. Trillas. México. pp: 305-318.
- Zheng, M. Z., G. Li, G. X. Sun, H. Shim, and C. Cai. 2013. Differential toxicity and accumulation of inorganic and methylated arsenic in rice. *Plant Soil* 365: 227-238.