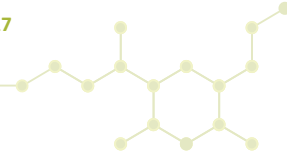


Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales

3^{era} Edición, Agosto 2017

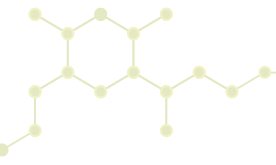


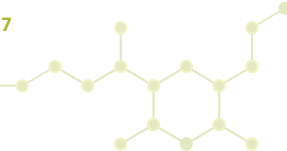


Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales 2017

División Laboratorio Ambiental

Montevideo, Agosto 2017





AUTORIDADES

Arq. ENEIDA DE LEÓN
Ministra de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

Arq. JORGE RUCKS
Subsecretario de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

Dr. HOMERO GUERRERO
Director General de Secretaría del Ministerio de Vivienda,
Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

Ing. Qco. ALEJANDRO NARIO
Director Nacional de Medio Ambiente

RESPONSABLE TÉCNICO

Q.F. Natalia Barboza
Directora División Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional de Medio Ambiente

ELABORACIÓN DE PROCEDIMIENTOS, REVISIÓN TÉCNICA

Q.F. Sandra Azambuya
Q.F. Natalia Barboza
Qco. Maite Capandeguy
Bach Qca. Roxana Gálvez
Qco. Estefanía Geymonat
T.Q. Carolina Grau
Q.F. Alejandro Mangarelli
Bach Qca. Vivían Muñoz
Q.F. Paola Panizza
Lic. Gabriela Pistone
Lic. Bq. Analía Sanabria
Q.F. Patricia Simone
Qco. Rodrigo Souza

RECOPIACIÓN Y EDICIÓN

Lic. Bq. Analía Sanabria

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

Departamento de Comunicación DINAMA

AGRADECIMIENTOS

Fundamentalmente a aquellos profesionales y técnicos de DINAMA que han estado vinculados a las actividades del Laboratorio, y que han participado en las etapas iniciales del proceso de elaboración de los procedimientos analíticos que se presentan en este manual.

A áreas de la DINAMA que aportaron a la concreción de este manual, Asesoría Jurídica, Departamento de Comunicación, para lograr la disponibilidad a terceros actores involucrados en el compromiso del cuidado ambiental.

A las áreas de DINAMA que trabajan cotidianamente con el laboratorio, los que con sus requerimientos suman desafíos a la División.

“Por nuestro ambiente hemos abierto caminos, unidos seguiremos recorriéndolos”



MVOTMA

Ministerio de Vivienda
Ordenamiento Territorial
y Medio Ambiente

Expte. 2017/16257

MINISTERIO DE VIVIENDA, ORDENAMIENTO TERRITORIAL Y
MEDIO AMBIENTE

26 OCT 2017

R.M. 1648/2017

Montevideo,

VISTO: la necesidad de mantener actualizado el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales" (Exp. 2017/ 14000/16257);

RESULTANDO: I) que por Resolución Ministerial Nº 110/2010 de 26 de enero de 2010, se aprobó el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales", 2ª edición, disponiéndose la obligatoriedad de los métodos y criterios técnicos contenidos en el mismo;

II) que la División Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional Medio Ambiente, ha actualizado el referido Manual, en el marco de sus actividades para mantener el fortalecimiento de las capacidades analíticas en el país, asegurando la calidad, confiabilidad y comparabilidad de los datos, mediante el empleo de métodos estandarizados y acordes a la evolución tecnológica a nivel nacional;

III) que en su tercera edición, el Manual se estructura en ocho secciones, incluyendo ochenta y siete procedimientos analíticos, de los cuales veinte son procedimientos nuevos y sesenta y siete son procedimientos actualizados de ediciones anteriores;

CONSIDERANDO: I) que la Dirección Nacional de Medio Ambiente, solicita la aprobación del "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales", 3ª edición, dándole carácter obligatorio para el uso válido de los resultados analíticos en procedimientos y tramitaciones de competencia de dicha unidad ejecutora;

II) que, como ediciones anteriores, el referido Manual se basa en métodos estandarizados de aceptación internacional, los que han sido adaptados teniendo en cuenta la experiencia del Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional de Medio Ambiente y de sus profesionales, con el apoyo del Programa de Modernización de la Institucionalidad para la Gestión y la Planificación Ambiental (Proyecto BID 3080/OC-UR);

III) que la generación de información ambiental debe realizarse sobre bases que ofrezcan garantías para una adecuada gestión ambiental, en todas sus etapas y para todos los sectores, en cumplimiento de los principios de la política nacional ambiental (artículo 6º de la Ley General de Protección del Ambiente);

ATENTO: a lo precedentemente expuesto y lo dispuesto en la Ley Nº 17.283, de 28 de noviembre de 2000, el artículo 13 del Decreto 253/979 de 9 de mayo de 1979, en la redacción dada por el artículo 7º del Decreto 195/991 de 4 de abril de 1991 y el Anexo IV del Decreto 255/013 de 19 de agosto de 2013;

LA MINISTRA DE VIVIENDA, ORDENAMIENTO
TERRITORIAL Y MEDIO AMBIENTE

R E S U E L V E:

1º.- Apruébase el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales", 3ª edición, elaborado por la División Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional Medio Ambiente, cuyos métodos y procedimientos técnicos resultarán obligatorios en toda presentación, intervención o requerimiento que incluya resultados analíticos en procedimientos y tramitaciones de evaluación, autorización o control ambiental.-

2º.- Cométase a la Dirección Nacional de Medio Ambiente la publicación del referido Manual y la instrumentación de mecanismos de difusión y capacitación en la materia.-




MVOTMA

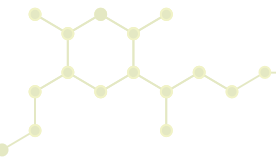
Ministerio de Vivienda
Ordenamiento Territorial
y Medio Ambiente

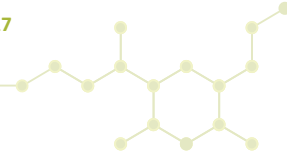
3º.- Exhórtase a otras entidades públicas que realicen análisis de laboratorio en matrices ambientales, a adoptar en el ámbito de sus respectivas competencias, los métodos y criterios técnicos contenidos en la tercera edición del Manual al que refiere esta Resolución.-

4º.- Déjase sin efecto la Resolución Ministerial N° 110/2010 de 26 de enero de 2010, por la que se aprobó la 2ª edición del Manual.-

5º.- Publíquese la presente resolución en el Diario Oficial (Sección Documentos) y vuelva a la Dirección Nacional de Medio Ambiente para su comunicación a las Áreas y Asesorías de la misma y a la Dirección Nacional de Aguas. Cumplido, vuelva a la División Laboratorio Ambiental y comuníquese a través de la Red de Laboratorios Ambientales de Uruguay (rlau).-


Arq. Eneida de León
Ministra de Vivienda,
Ordenamiento Territorial
y Medio Ambiente





CONTENIDO

Sección 1

Parámetros Físico-Químicos Generales

- 1002UY Alcalinidad
- 1003UY Alcalinidad (titulador automático)
- 1005UY Color (comparación visual)
- 1006UY Conductividad
- 1011UY Dureza Total
- 1012UY Dureza total (determinación por cálculo)
- 1016UY pH en suelo y sedimentos
- 1017UY Determinación de pH
- 1018UY Silicatos
- 1019UY Sólidos sedimentables
- 1020UY Sólidos suspendidos (totales, fijos y volátiles)
- 1021UY Sólidos (totales, fijos y volátiles)
- 1022UY Turbidez
- 1050UY Determinación de humedad
- 1073UY Material Particulado en Aire (PTS –PM 10)
- 1074UY Índice de Corrosividad en Aire

Sección 2

Parámetros Orgánicos Generales

- 2001UY Aceites y Grasas
- 2002UY Hidrocarburos
- 2007UY DBO Respirometría
- 2008UY DBO5
- 2009UY DQO
- 2010UY Detergentes Aniónicos
- 2011 DQO en bajas concentraciones

Sección 3

Parámetros Metálicos

3.1 Determinación

- 3107UY Calcio (titulométrico)
- 3123UY Aluminio
- 3127UY Bario
- 3128UY Cadmio
- 3129UY Calcio (absorción atómica)
- 3133UY Cinc
- 3134UY Cobre
- 3135UY Cromo Total
- 3138UY Hierro
- 3139UY Magnesio
- 3140UY Manganeso
- 3141UY Mercurio
- 3142UY Niquel
- 3145UY Plata
- 3146UY Plomo
- 3147UY Potasio
- 3149UY Sodio
- 3164UY Determinación de Cromo VI
- 3190UY Determinación de metales por ICP-MS

3.2 Tratamiento de la Muestra y Control de Calidad

- 3236UY Digestión de Líquidos en Sistema Cerrado
- 3237UY Digestión en Sistema Abierto
- 3238UY Digestión de Líquidos en Sistema Cerrado
- 3260UY Metales en Material Particulado
- 3261UY Caracterización de toxicidad de lixiviado
- 3262UY Digestión de Sólidos en Sistema Cerrado
- 3276UY Determinación por Adiciones Estándares
- 3281UY Digestión de sólidos para determinación de Cr VI

Sección 4

Parámetros Inorgánicos No Metálicos

- 4003UY Amonio (potenciométrico)
- 4004UY Amonio (FIA)
- 4012UY Fósforo Reactivo
- 4013UY Fósforo Total
- 4014UY Fósforo Total (FIA)
- 4015UY Fósforo Disponible en Suelo
- 4029UY Aniones Inorgánicos (Cromatografía Iónica)
- 4030UY Aniones Inorgánicos (HPLC)
- 4031UY Cianuro Total (espectrofotométrico)
- 4032UY Cianuro Libre (espectrofotométrico)
- 4051UY Sulfuro (medida directa)
- 4052UY Sulfuro (titulación potenciométrica)
- 4067UY Cianuro libre (potenciométrico)
- 4068UY Cianuro Total (potenciométrico)
- 4077UY Fluoruro
- 4080UY Amonio (espectrofotométrico)
- 4085UY Nitrato (FIA)
- 4086UY Nitrito
- 4087UY Nitrito (FIA)
- 4090UY NTK (FIA)

Sección 5

Parámetros Microbiológicos

- 5053UY Coliformes Termotolerantes (filtración por membrana)
- 5054UY Coliformes Totales (filtración por membrana)
- 5055UY Coliformes Totales y Escherichia coli
- 5058UY Enterococos (filtración por membrana)
- 5065UY Coliformes Termotolerantes (incubación tardía)
- 5070UY Verificación de Enterococos
- 5071UY Verificación de Coliformes Totales
- 5072UY Verificación de Coliformes Termotolerantes
- 5077UY Coliformes Termotolerantes residuos sólidos
- 5079UY Enterococos (sustrato definido)

Sección 6

Parámetros de Ecotoxicidad

6.1 Determinación

6159UY Toxicidad aguda (Basic Test)

6.2. Tratamiento de la Muestra y Control de Calidad

6201UY Preparación de Muestras de Residuos para
Ensayos de Ecotoxicidad

Sección 7

Parámetros Biológicos

7004UY Clorofila

Sección 8

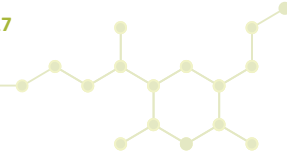
Parámetros Orgánicos

8084UY AOX

8085UY Determinación de PCB

8086UY Determinación de PCB (muestras sólidas)

8087UY Determinación Plaguicidas Organoclorados



ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

Medidas y Unidades

Abs – absorbancia
 UA – unidades de absorbancia
 atm – atmósfera
 kPa – kilopascal
 M – molar
 N – normal
 g/L – gramos por litro
 g/mL – gramos por mililitro
 L/min – litros por minuto
 mg/cm²/ 30días – miligramos por centímetro cuadrado cada treinta días
 mg/L – miligramos por litro
 mL/L – mililitros por litro
 m³/min – metros cúbicos por minuto
 p/p – peso en peso
 µg/L – microgramos por litro
 µg/m³ – microgramo por metro cúbico
 v/v – volumen en volumen
 lo – luminosidad a tiempo cero
 NTU – Unidades de Turbidez Nefelométrica
 ufc – unidades formadoras de colonias
 µmho/cm – micromhos por centímetro
 µS/cm – microsiemens por centímetro

Reactivos

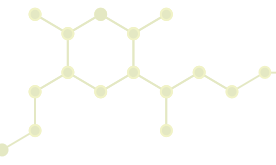
EDTA – etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado
 ISA – solución reguladora de fuerza iónica
 LAS – sulfonato de alquilbenceno lineal
 NET – Negro de Eriocromo – T
 OAS – solución de ajuste osmótico
 ONPG – ortonitrofenil galactósido
 TSA – tripticasa soya agar
 CLT – caldo lauril triptosa

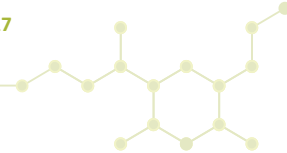
Parámetros y Metodologías

AOX – compuestos orgánicos halogenados adsorbibles
 DBO – demanda bioquímica de oxígeno
 DQO – demanda química de oxígeno
 IC – cromatografía iónica
 EAA – Espectrofotometría de absorción atómica
 ECD – detector de captura electrónica
 FIA – Análisis por inyección en flujo continuo, por su sigla en inglés
 HPLC – Cromatografía líquida de alta performance, por su sigla en inglés
 ICP - MS – Plasma acoplado inductivamente con detector de masas, por su sigla en inglés
 MBAS – surfactante aniónicos sensibles al azul de metileno
 NMP – número más probable
 NTK – nitrógeno total Kjeldahl
 PCB – bifenilos policlorados
 PM10 – partículas menores a 10 µm de diámetro
 PTS – partículas totales suspendidas

Otros

CO – citocromo oxidasa
 FD – factor de dilución
 INE – Instructivo de equipos
 LC – límite de cuantificación
 LD – límite de detección
 LR – límite de reporte
 RAD – Registro administrativo
 RCE – Registro de control de equipo
 RMB – Ruta de análisis de parámetro microbiológico
 RIN – Ruta de análisis de parámetro de sector instrumental
 RIG – Registro de Ingreso
 RET – Ruta de análisis de parámetro ecotoxicidad
 RFQ – Ruta de análisis parámetro fisicoquímico
 RPR – Registro de preparación de reactivos y estándares
 RPS – Registro de preparación de soluciones control





PRÓLOGO

Entre esta tercera edición del Manual de procedimientos analíticos para muestra ambientales y la anterior, pasaron 8 años, en los que se produjeron grandes logros en el Laboratorio Ambiental. El contexto político, jurídico y técnico evolucionó de manera trascendente en materia ambiental y el laboratorio acompañó esa evolución, manteniendo y aumentando sus acreditaciones (ISO/IEC 17025), certificaciones (ISO 9001) y aumentando sus capacidades técnicas.

En estos años, los desafíos en términos ambientales, a nivel nacional y global, se incrementaron notablemente. Esto requirió y requiere por parte de nuestro ministerio una adaptación y una evolución constante para atender las nuevas exigencias. El crecimiento y las capacidades desarrolladas por el Laboratorio Ambiental dan cuenta de ello y son garantes de la experticia técnica que caracteriza a la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Dinama).

En el transcurso de estos años hay algunos hitos que me parece relevantes destacar:

En el año 2010, tuvimos el fallo favorable de La Haya en relación al conflicto entre Argentina y Uruguay por las plantas de celulosa. En esta instancia, los resultados obtenidos en los ensayos realizados y gestionados por el Laboratorio Ambiental fueron corroborados por organizaciones internacionales y constituyeron evidencia en el juicio llevado a cabo en la Corte Internacional de Justicia.

Entre los años 2011 y 2013, el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (Mvotma) apostó por la construcción de nueva planta física para su laboratorio, en una sede 5 veces más grande que la que se tenía. La mudanza que se concretó en 2013, y la nueva infraestructura permitió aumentar un 80 % la capacidad de trabajo y posicionar al Laboratorio Ambiental como un laboratorio de referencia a nivel nacional y en América Latina.

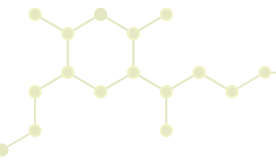
En el año 2014, a partir de la reestructura de nuestro ministerio, el laboratorio paso a conformarse en una División, manteniendo su dependencia directa con la Dirección Nacional, lo que permite trabajar transversalmente con todas las áreas de Dinama e incluso con otras direcciones nacionales del Mvotma.

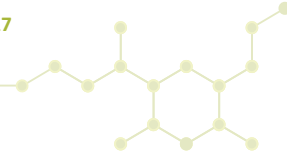
En estos años continúo y continúa el trabajo con la Red de Laboratorios Ambientales de Uruguay (Rlau), aunando esfuerzos con el Organismo uruguayo de Acreditación para trabajar en subdisciplinas de parámetros y lograr la acreditación en grupo y no necesariamente de forma individual.

En 2016 quedó disponible el Directorio de Laboratorios de Uruguay, una herramienta de consulta para la ciudadanía en general con información de capacidad analítica nacional instalada en el país, con enfoque a la calidad de la información brindada por los terceros actores. La plataforma también permite identificar las debilidades del sistema en ese aspecto y elaborar estrategias de trabajo y coordinación para saltar las brechas existentes.

No quiero cerrar estas líneas sin reconocer el trabajo sin pausa llevado a cabo por el equipo técnico del Laboratorio Ambiental, que se ve reflejado en este Manual, con metodologías que pueden ser aplicadas a una variedad de matrices ambientales, como aguas, efluentes líquidos industriales y/o domésticos, residuos sólidos, sedimentos, suelos y aire.

Ing. Quím. Alejandro Nario
Director Nacional de Medio Ambiente





INTRODUCCIÓN

La tercera edición del Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales, del año 2017, mantiene la estructura de ocho secciones que agrupan un total de 87 procedimientos técnicos, de los cuales 19 son procedimientos nuevos.

Estas ocho secciones son:

- *Fisicoquímicos generales*
- *Orgánicos generales*
- *Metálicos*
- *Inorgánicos no metálicos*
- *Microbiológicos*
- *Ecotoxicológicos*
- *Biológicos*
- *Orgánicos*

Estas metodologías reflejan el esfuerzo de revisión y validación de las normativas internacionales, como la Asociación Americana de Salud Pública – Métodos Estándares para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales (APHA); las normas publicadas por la Organización Internacional de Estandarización (ISO); la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA – USA); y el Ministerio de Canadá, llevado a cabo por un grupo de trabajo maduro y experimentado.

Al igual que en la edición previa, los procedimientos estandarizados de operación incluidos en este Manual son los que emplea el Laboratorio Ambiental en los ensayos de rutina. Por estos motivos, pueden existir referencias a equipos o documentos específicos o formatos de registro propios del Laboratorio Ambiental de Dinama, los cuales deberán ser adaptados por cada laboratorio previo a su uso.

El uso de marcas es a título informativo y para más fácil identificación, pero no necesariamente impliquen una exclusividad de uso.

Invitamos a profesionales y técnicos que trabajen en actividades relacionadas al contenido del manual, a que viertan sus comentarios o consultas, de manera de facilitar la comunicación y el trabajo coordinado entre las instituciones, tanto públicas como privadas, nucleadas en gran parte en la red de laboratorios ambientales del Uruguay (Rlau). Recordamos que el laboratorio dispone del correo electrónico: laboratorio.dinama@mvotma.gub.uy.

Y por último recordar que complementariamente a los manuales impresos, el contenido del presente manual se encuentra disponible en la página web del Mvotma: www.mvotma.gub.uy.

Q.F. Natalia Barboza
Directora División
Laboratorio Ambiental
Dinama - Mvotma



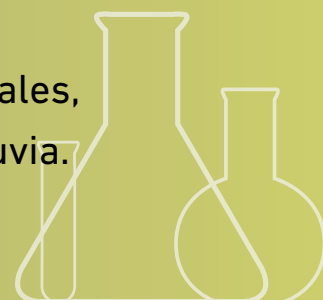
SECCIÓN 1





1002UY

Determinación de alcalinidad en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y aguas de lluvia.



Método titulométrico

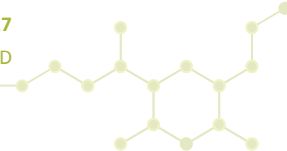
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físcoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas y aguas de lluvia. El límite de cuantificación es de 11 mg/L. Esta técnica se aplicará siempre y cuando no se cuente con titulador automático.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16A, INE 16B)
- 2.6. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 98, INE 118)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 02)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La alcalinidad del agua es su capacidad para neutralizar un ácido. La alcalinidad de aguas naturales, residuales y residuales tratadas se debe principalmente a los aniones bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos. Los valores medidos incluyen también la contribución de los iones boratos, fosfatos, silicatos y otras bases que puedan estar presentes.
- 3.2. La alcalinidad en el punto de pH 8,3 es la correspondiente a los iones hidróxido más la mitad de la concentración de los iones carbonatos. Alcalinidad total es la atribuible a los iones hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos.
- 3.3. La alcalinidad se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico. El punto de equivalencia del bicarbonato es a pH 8,3 y el del ácido carbónico a pH 4,5. Como indicador de estos puntos se utiliza un electrodo de pH.
- 3.4. Si la muestra tiene un pH mayor de 8,3 debe realizarse el análisis correspondiente a la alcalinidad de los dos puntos anteriormente mencionados.
- 3.5. En caso de tener algún inconveniente con el electrodo de pH pueden utilizarse reactivos indicadores para determinar los puntos de equivalencia a pH 8,3 (fenoftaleína) y a pH 4,5 (verde de bromocresol).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los jabones, materia grasa, sólidos suspendidos o precipitados pueden cubrir el electrodo de vidrio y causar una respuesta lenta del electrodo. Se requiere limpiar el electrodo ocasionalmente y tener la precaución de permitir que el electrodo alcance el equilibrio luego de cada agregado del ácido.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar 250 mL de muestra en recipientes de plástico (polietileno o equivalente) o botellas de vidrio de borosilicato de buen cierre, sin cámara de aire. Mantener la muestra refrigerada $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Realizar la determinación dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones.
- 7.2. Electrodo de hidrógeno de vidrio que lea 0,05 unidades de pH. Si no tiene compensación automática de temperatura, titular a $25\text{ }^{\circ}\text{C} + 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. El mismo se detalla a continuación:
Electrodo Orión 8102BNUWP con su solución de relleno Orión 810007.
Solución de almacenamiento para electrodo Orión 810001.

- 7.3. Buretas 10,0 mL y 25,0 mL con apreciación de 0,05 mL.
- 7.4. Agitador magnético y barras agitadoras.
- 7.5. Erlenmeyer o vasos de Bohemia de 100 y 250 mL.
- 7.6. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.7. Balanza de resolución 0,0001 g

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8) 0,05 N: secar 3 a 5 g de estándar primario Na_2CO_3 a 250 °C durante 4 horas y enfriar en desecador. Pesar $2,5 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ con una precisión de 1 mg, transferir a matraz aforado de 1 L y enrasar con agua desionizada. Preparar en forma semanal.
- 8.3. Solución estándar de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 0,1 N: disolver 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado en 1 L de agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N
- 8.4. Solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: diluir 5 veces el ácido sulfúrico 0,1 N con agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N.
- 8.5. Indicador de fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ Nro. CAS 77-09-8) 5 g/L: disolver 0,5 g de fenolftaleína en 50 mL de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ Nro. CAS 64-17-5) al 95 % y añadir 50 mL de agua desionizada.
- 8.6. Indicador verde de bromocresol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ Nro. CAS 76-60-8): disolver 100 mg de sal sódica de verde de bromocresol en 100 mL de agua destilada.
- 8.7. Soluciones comerciales buffers estándar de pH $4,00 \pm 0,01$, $7,00 \pm 0,01$ y $10,00 \pm 0,02$.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Evitar el derrame de ácido tanto sobre zonas expuestas del analista como de las mesadas o el material a emplear.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Valoración de la solución estándar de ácido sulfúrico 0,1 N: Preparar la solución ácida de normalidad aproximada. Estandarizar contra 40,00 mL de solución de Na_2CO_3 0,05 N adicionando alrededor de 60 mL de agua en un Erlenmeyer titulando hasta pH aproximado de 5. El gasto se puede medir en bureta de 25,00 mL. En forma alternativa, tomar 10,00 mL de solución de Na_2CO_3 0,05 N en un Erlenmeyer y adicionar 40 mL de agua destilada. Titular con el ácido sulfúrico correspondiente en bureta de 10,00 mL hasta aproximadamente pH 5. En ambos casos, retirar el electrodo, enjuagar dentro del mismo recipiente y llevar a ebullición la solución contenida en el Erlenmeyer, cubierto con un vidrio de reloj entre 3 y 5 minutos. Dejar que llegue a temperatura ambiente, y finalizar la titulación llegando a pH 4,5. Obtener concordancia de dos valoraciones.
- 10.2. Valoración de la solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: Seguir el procedimiento del punto anterior tomando 5,00 mL de Na_2CO_3 0,05 N llevando a 50 con agua destilada. Valorar el ácido en bureta de 25,0 mL. La normalidad del ácido sulfúrico estándar es:

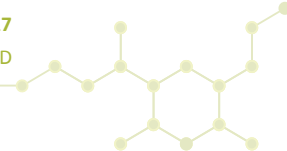
$$N = \frac{C \times T}{53 \times G}$$

donde:

C: corresponde a g/L de la solución estándar de Na_2CO_3

T: corresponde a mL de solución de carbonato de sodio tomados para la valoración del ácido

G: corresponde a mL de ácido utilizados en su valoración



11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Tomar alrededor de 100 mL de muestra en un vaso de Bohemia o Erlenmeyer de forma que el electrodo quede cubierto por la muestra.

Nota 2: La toma de la muestra debe ser tal que el gasto generado esté entre el 20 % y el 90 % del volumen total de la bureta. Realizar la toma en peso en balanza de precisión 0,01 g. Si el volumen de muestra no alcanza para que el electrodo quede sumergido, completar con agua destilada. En este caso, realizar un blanco de agua destilada.

Titulación potenciométrica:

11.2. Calibrar el electrodo con las soluciones buffers de pH 4,00, 7,00 y 10,00 según las instrucciones del analizador de iones.

11.3. Sumergir el electrodo dentro de la muestra hasta la punta inferior (del serpentín) inclusive. Titular con la solución estándar de ácido sulfúrico que corresponda según el gasto esperado (según antecedentes u origen de la muestra). Agitar la muestra con agitador magnético durante la valoración. Si el pH original de la muestra es mayor que 8,3 registrar el gasto de ácido consumido hasta ese valor de pH y seguir valorando.

11.4. Valorar hasta que la medida de pH sea 4,5; registrar el gasto de ácido.

Nota 3: Para muestras de alcalinidad menor a 20 mg CaCO₃/L valorar con el ácido sulfúrico 0,02 N hasta pH 4,5 registrar el gasto de ácido a ese pH y continuar la valoración hasta pH 4,2 y registrar también este gasto de ácido.

Titulación con reactivos indicadores:

11.5. Alcalinidad total: agregar 0,1 mL de indicador verde de bromocresol a la muestra contenida en el vaso de Bohemia. Titular con solución estándar de ácido sulfúrico que corresponda según el gasto esperado. Agitar la muestra durante la valoración, se recomienda utilizar agitador magnético. Valorar hasta el viraje de color azul a verde según el reactivo indicador utilizado; registrar el gasto de ácido.

11.6. Alcalinidad correspondiente a pH 8,3 determinada por viraje de fenolftaleína: agregar dos gotas del indicador de fenolftaleína a la muestra contenida en el Erlenmeyer. Titular con solución de ácido sulfúrico valorado 0,02 N hasta viraje de color rosado a incoloro, registrar el gasto de ácido. Agitar la muestra durante la valoración, se recomienda utilizar agitador magnético.

Nota 4: Valores de alcalinidad menores a 20 mg CaCO₃/L no pueden ser determinados por titulación con reactivo indicador.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Si la alcalinidad es mayor a 20 mg CaCO₃/L:

$$\text{Alcalinidad, mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{G \times N \times 50000}{T}$$

donde:

G: corresponde al gasto de ácido sulfúrico utilizado en la titulación ya sea a pH 4,5 o al viraje de verde de bromocresol.

N: corresponde a la normalidad del ácido sulfúrico utilizado para la determinación.

T: corresponde a mL de muestra valorada (asumiendo densidad 1 g/L para muestras de aguas y determinada en los casos que corresponda).

12.2. Si la alcalinidad es menor a 20 mg CaCO₃/L:

$$\text{Alcalinidad, mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{(2 \times G1 - G2) \times N \times 50000}{T}$$

donde:

G1: corresponde al gasto de ácido sulfúrico a pH 4,5

G2: corresponde al gasto de ácido sulfúrico a pH 4,2

N: corresponde al normalidad del ácido sulfúrico utilizado para la determinación.

T: corresponde al mL de muestra valorada

Informar el pH del punto final como se indica: "Alcalinidad a pH = _____ = _____ mg CaCO₃ /L"

Cálculo de relaciones de alcalinidad:

12.3. Si pH es mayor a 8,3, se puede establecer la relación estequiométrica entre las tres principales formas de alcalinidad presente en muchas aguas según:

Tabla de relaciones de alcalinidad

| Resultado de la titulación | Hidróxido Alcalinidad como CaCO ₃ | Carbonato Alcalinidad como CaCO ₃ | Concentración de Bicarbonatos como CaCO ₃ |
|----------------------------|--|--|--|
| P = 0 | 0 | 0 | T |
| P < 1/2T | 0 | 2P | T - 2P |
| P = 1/2T | 0 | 2P | 0 |
| P > 1/2T | 2P - T | 2 (T-P) | 0 |
| P = T | T | 0 | 0 |

P corresponde a la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína.

T corresponde a la alcalinidad total correspondiente a pH 4,5 o determinada por viraje de verde de bromocresol.

1. La alcalinidad de carbonatos está presente cuando la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína no es cero pero es menor a la alcalinidad total.
2. La alcalinidad de hidróxidos está presente si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína es más de la mitad de la alcalinidad total.
3. Existe alcalinidad de bicarbonatos si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína es menor a la mitad de la alcalinidad total. Esta relación puede ser calculada por la tabla anteriormente expuesta. Seleccionar el menor valor de P o (T-P). Allí la alcalinidad de carbonatos es dos veces el menor valor. Cuando el menor valor es P, el balance (T-2P) es bicarbonato. Cuando el menor valor es (T-P), el balance (2P-T) es hidróxido. Todos los resultados son expresados como CaCO₃.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la precisión: se realiza un duplicado cada tres muestras, y como mínimo un duplicado por serie.

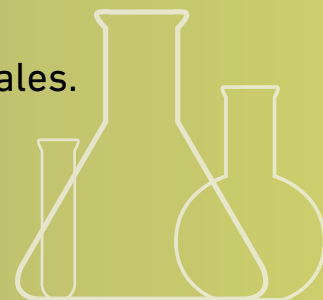
13.2. Control de exactitud: valorar una solución control de similar concentración que la usada para estandarizar el ácido por serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2320 A Alcalinidad Introducción y 2320 B Titration Method pp 2-34 a 2-36.

1003UY

Determinación de alcalinidad en aguas naturales.



Método titulométrico automatizado

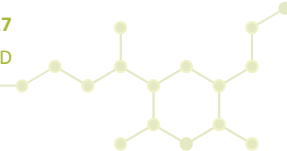
Elaborado - C. Grau

Modificado - No aplica

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de alcalinidad en aguas naturales. El límite de cuantificación es de 10 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 94).
- 2.6. Instructivo de uso de titulador automático (INE 119).
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 37).
- 2.8. Planilla de cálculo electrónica.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La alcalinidad de un agua es su capacidad para neutralizar un ácido. La alcalinidad de aguas naturales se debe principalmente a los aniones bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos. Los valores medidos incluyen también la contribución de los iones boratos, fosfatos, silicatos y otras bases que puedan estar presentes.
- 3.2. La alcalinidad en el punto de pH 8,3 es la correspondiente a los iones hidróxido más la mitad de la concentración de los iones carbonatos. Alcalinidad total es la atribuible a los iones hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos.
- 3.3. La alcalinidad se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico. El punto de equivalencia del bicarbonato es a pH 8,3 y el del ácido carbónico a pH 4,5. Como indicador de estos puntos se utiliza un electrodo de pH.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los jabones, materia grasa, sólidos suspendidos o precipitados pueden cubrir el electrodo de vidrio y causar una respuesta lenta del electrodo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar 250 mL de muestra en recipientes de plástico (polietileno o equivalente) o botellas de vidrio de borosilicato de buen cierre, sin cámara de aire. Mantener la muestra refrigerada $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Realizar la determinación dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Titulador automático (Metrohm 848 Titrino plus o similar).
- 7.2. Agitador magnético (Metrohm 801 o similar) y barras agitadoras.
- 7.3. Electrodo de hidrógeno de vidrio (Metrohm Pt 1000/B/2/3M KCl o similar). Si el electrodo no tiene compensación automática de temperatura, titular a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.4. Erlenmeyer o vasos de Bohemia de 100 y 250 mL.
- 7.5. Matraces aforados de 500 y 1000 mL.
- 7.6. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.7. Balanza de resolución 0,0001 g

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8) 0,05 N: secar 3 a 5 g de estándar primario Na_2CO_3 a 250 °C durante 4 horas y enfriar en desecador. Pesar $2,5 \pm 0,2$ g con una precisión de 1 mg, transferir a matraz aforado de 1 L y enrasar con agua desionizada. Preparar en forma semanal.
- 8.3. Solución estándar de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 0,1 N: disolver 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado en 1 L de agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N
- 8.4. Solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: diluir 5 veces el ácido sulfúrico 0,1 N con agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N.
- 8.5. Soluciones comerciales buffers estándar de pH $4,00 \pm 0,01$, $7,00 \pm 0,01$ y $10,00 \pm 0,02$.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 9.1. Valoración de la solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: realizar una toma aproximada de 3,00 mL de Na_2CO_3 0,05 N y llevar a 60,00 mL con agua desionizada. Registrar ambos datos en la ruta de análisis. Valorar el ácido en el titulador automático según INE 119.

La normalidad del ácido sulfúrico estándar es:

$$N = \frac{C \times T}{53 \times G}$$

donde:

C: corresponde a g/L de la solución estándar de Na_2CO_3

T: corresponde a mL de solución de carbonato de sodio tomados para la valoración del ácido

G: corresponde a mL de ácido utilizados en su valoración

10. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 10.1. Evitar el derrame de ácido tanto sobre zonas expuestas del analista como de las mesadas o el material a emplear.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Realizar una toma de muestra entre 50 y 100 mL en un vaso de Bohemia o Erlenmeyer de forma que el electrodo quede cubierto por la muestra. La toma debe ser realizada en peso en balanza de resolución 0,01g.
- 11.2. Calibrar el electrodo con las soluciones buffers de pH 4,00, 7,00 y 10,00 según INE 119.
- 11.3. Sumergir el electrodo dentro de la muestra y titular con la solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N según INE 119.
- 11.4. Registrar dato obtenido en RFQ 37 luego de la determinación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Se calcula la concentración de alcalinidad en la muestra mediante la siguiente fórmula:

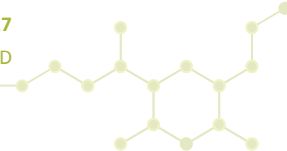
$$\text{Alcalinidad, mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{G \times N \times 50000}{T}$$

donde:

G: corresponde al gasto de ácido sulfúrico utilizado en la titulación.

N: corresponde a la normalidad del ácido sulfúrico utilizado para la determinación.

T: corresponde a mL de muestra valorada (asumiendo densidad 1 g/L para muestras de aguas y determinada en los casos que corresponda).



Cálculo de relaciones de alcalinidad

12.2. Si pH es mayor a 8,3, se puede establecer la relación estequiométrica entre las tres principales forma de alcalinidad presente en muchas aguas según:

Tabla de relaciones de alcalinidad

| Resultado de la titulación | Hidróxido Alcalinidad como CaCO_3 | Carbonato Alcalinidad como CaCO_3 | Concentración de Bicarbonatos como CaCO_3 |
|----------------------------|--|--|--|
| $P = 0$ | 0 | 0 | T |
| $P < 1/2T$ | 0 | 2P | $T - 2P$ |
| $P = 1/2T$ | 0 | 2P | 0 |
| $P > 1/2T$ | $2P - T$ | $2(T - P)$ | 0 |
| $P = T$ | T | 0 | 0 |

P: corresponde a la alcalinidad correspondiente a pH 8,3.

T: corresponde alcalinidad total correspondiente a pH 4,5.

1. La alcalinidad de carbonatos está presente cuando la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 no es cero pero es menor a la alcalinidad total.
2. La alcalinidad de hidróxidos está presente si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 es más de la mitad de la alcalinidad total.
3. Existe alcalinidad de bicarbonatos si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 es menor a la mitad de la alcalinidad total.

Esta relación puede ser calculada por la tabla anteriormente expuesta. Seleccionar el menor valor de P o $(T - P)$. Allí la alcalinidad de carbonatos es dos veces el menor valor. Cuando el menor valor es P, el balance $(T - 2P)$ es bicarbonato. Cuando el menor valor es $(T - P)$, el balance $(2P - T)$ es hidróxido. Todos los resultados son expresados como CaCO_3 .

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la precisión:** analizar por duplicado una de cada 3 muestras, mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, siendo 10 % el máximo aceptado de dispersión hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.2. **Control de la exactitud:** analizar una solución control de concentración cercana a las muestras analizadas y otra a una concentración de 10 mg/L aproximadamente. Obtener los resultados de los porcentajes de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlos con los límites de aceptación correspondientes, siendo 90 - 110 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard method for examination of water and wastewater, 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2320 A Introduction y 2320 B Titration Method pp 2-34 a 2-36



1005UY

Determinación de color en aguas naturales y en efluentes industriales comparables con el hexacloroplatinato de potasio.

Método de comparación visual

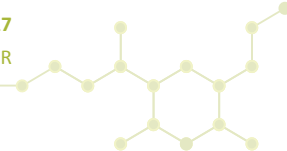
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físcoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. OBJETIVO

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de color en aguas naturales y en algunos efluentes industriales (aquellos que lo permiten por las distintas tonalidades que presenten, ya que estas deben ser comparables con la tonalidad de la solución de hexacloroplatinato de potasio). El límite de cuantificación es de 10 unidades de color.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de Balanza (INE 94)
- 2.6. Instructivo de pH-metro (INE 98)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 04)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El color en aguas superficiales y de fondo, resulta primariamente de la presencia de material orgánico natural, particularmente sustancias húmicas.
- 3.2. Se determina la intensidad del color amarillo-amarronado de la muestra en comparación visual con una curva estándar de cloroplatinato de potasio. El resultado se expresa en términos de mg/L Pt representando la intensidad producida por la curva.
- 3.3. En el presente método se toma como unidad de color aquella producida por una solución de 1 mg/L de platino en la forma ion cloroplatinato.
- 3.4. El término color se utiliza para la descripción de color verdadero, o sea aquel en que la turbidez del agua ha sido removida. El término color aparente incluye no solamente color debido a sustancias en la solución, sino también a material en suspensión. El color aparente es determinado en la muestra original sin realizar filtración ni centrifugación.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El color se determina por comparación visual de la muestra contra concentraciones conocidas de solución patrón coloreada. Por lo tanto si la muestra es muy coloreada, diluirla para realizar el análisis.
- 5.2. El valor de color del agua es extremadamente dependiente del valor de pH por lo tanto se debe informar el pH al cual se hizo la medida de color.
- 5.3. Una escasa turbidez puede hacer que el color aparente sea informado con un valor mayor que el color verdadero, por lo tanto la turbidez debe ser removida por filtración.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar 100 mL de muestra en recipientes limpios de vidrio color ámbar enjuagados con ácido clorhídrico 1+1 o en botellas plásticas (polietileno o similar) protegidos de la luz. Realizar la determinación de color dentro de las 24 h de extraída la muestra debido a que los cambios biológicos o físicos que ocurren durante el almacenamiento pueden cambiar el color. Con aguas naturales coloreadas estos cambios llevan a resultados pobres. Por lo tanto, una vez tomada la muestra, refrigerarla a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) si no se realiza la determinación inmediatamente y llevarlas a temperatura ambiente antes de medir.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Tubos Nessler de 50 mL de capacidad, de fondo chato y con tapón. Ubicarlos en el soporte correspondiente.
- 7.2. pH-metro y electrodo de pH
- 7.3. Soluciones estándares de pH conocido necesarias para calibrar el instrumento.
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (Precisa 205 o similar)
- 7.5. Matraz aforado de 500 y 1000 mL
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable 1-10 mL
- 7.7. Lámpara para observación de color

Para la determinación de color verdadero además de lo anterior, se emplea lo siguiente:

- 7.8. Filtros de membrana de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro de 22 o 47 mm de diámetro.
- 7.9. Erlenmeyers de 100 mL para alojar el filtrado
- 7.10. Equipo de filtración: bomba de vacío, kitasato para trampa de agua, recipiente recolector de filtrado, soporte de filtro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6 Nro. CAS 16921-30-5) PA.
- 8.3. Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7391-13-1) PA.
- 8.4. Ácido clorhídrico concentrado (HCl cc Nro. CAS 7647-01-0) PA.
- 8.5. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) PA.
- 8.6. Solución estándar stock de 500 unidades de color: disolver 1,246 g de cloroplatinato de potasio (equivalente a 500 mg de platino metálico) y 1,00 g de cristales de cloruro de cobalto en agua desionizada con 100 mL de HCl concentrado y diluir a 1000 mL con agua desionizada. Asimismo se pueden emplear soluciones comerciales de esta concentración, las cuales pueden ser empleadas como estándar primario.

Nota 1: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

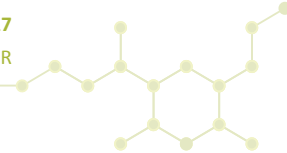
- 9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Realizar una curva de calibración de color con estándares de entre 5, 10,15, 20, 25, 30, 40, 50, y 100 unidades de color, diluyendo 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 y 20 mL de la solución stock, con agua destilada a 100 mL en matraces aforados. Transferir a tubos Nessler, proteger de la evaporación y contaminación cuando no se use. Se realiza para cada determinación, o preservar en oscuridad por un mes. Para tubos Nessler que presentan aforo en 50 mL, tomar la mitad de las cantidades referidas, colocarlas en los tubos y llevar con agua destilada hasta la marca correspondiente del tubo.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Permitir la termostatación de las muestras a temperatura ambiente.
- 11.2. Medir el pH de la muestra, si se encuentra fuera del rango 4 a 10, ajustar preferentemente a 7 y tomar nota del ajuste.
- 11.3. Si se desea medir el color verdadero, lavar el filtro y el equipo de filtración pasando por lo menos 50 mL de agua. Filtrar 25 mL de muestra y descartar. Filtrar otros 50 mL y conservar para su análisis
- 11.4. Observar el color de la muestra, colocándola en un tubo Nessler hasta la marca de 50 mL. Compararla con los estándares. Mirar verticalmente hacia abajo, a través de los tubos teniendo por fondo una superficie



blanca o especular, ubicada en un ángulo de tal forma que la luz proveniente de la lámpara refleje y atraviese la columna de líquido en la dirección en que se observa. Si hay turbidez presente y no se ha eliminado, informar el color como color aparente.

11.5. Si el color medido excede las 100 unidades, tomar en el tubo Nessler, una alícuota de la muestra y completar a 50 mL con agua destilada hasta que el color se encuentre dentro de la escala de estándares.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular las unidades de color por la siguiente ecuación:

$$\text{Color, Unidades de color} = \frac{A \times 50}{B}$$

donde:

A: corresponde al color estimado de la muestra diluida.

B: corresponde a los mL de muestra tomados para la dilución.

12.2. Expresar los resultados de color en números enteros y según el rango redondear al próximo número utilizando la unidad mínima indicada:

| Rango de color | Unidad mínima |
|----------------|---------------|
| 1 - 50 | 1 |
| 51 - 100 | 5 |
| 101 - 250 | 10 |
| 251 - 500 | 20 |

Ej. Resultado de color 83 unidades de color, valor a informar 85 unidades de color.

Nota 2: Si la muestra no fue filtrada informar color aparente.

12.3. Informar el pH de la muestra.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Realizar un duplicado cada tres muestras y por lo menos uno por serie.

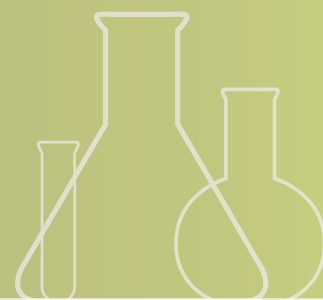
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA)(2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 2120 A Color Introduction y 2120 B Visual Comparison Method, pp 2-5 al 2-7.



1006UY

Determinación de conductividad en aguas y efluentes industriales.



Método conductimétrico

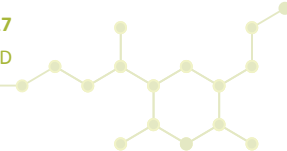
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la medida de conductividad en aguas y efluentes industriales.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Tabla: “Metodologías Límite de Detección y de Cuantificación” Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.6. Instructivo de equipo (INE 04)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La conductividad es la capacidad que posee una solución acuosa de conducir la corriente eléctrica, dicha habilidad depende de la concentración total de iones, de la movilidad y valencia de los mismos, así como también de la temperatura a la que se realiza la medida.
- 3.2. El método consiste en la medida directa de la conductividad, utilizando una celda, previamente estandarizada con una solución de conductividad conocida.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. El análisis puede ser realizado tanto en campo como en el laboratorio.
- 6.2. Recolectar 250 mL de la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C). El análisis debe realizarse dentro de los 7 días de tomada la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Conductímetro con corrección de temperatura. En forma alternativa, si el equipo no incluyera la corrección, se debe contar con un termómetro externo para corregir la conductividad de acuerdo a tablas.
- 7.2. Celda de conductividad correspondiente.
- 7.3. Vasos de Bohemia que permitan alojar la celda y la cantidad de solución adecuada a la celda que se esté empleando.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución estándar de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7) 0,0100 M: disolver 0,7456 g de cloruro de potasio anhidro (KCl) en agua destilada y diluir a 1 L en matraz aforado a 25 °C; mantener en atmósfera libre de CO₂. Esta solución estándar de referencia tiene a 25 °C, una conductividad de 1412 μ S/cm. Preservar dicha solución en un frasco de vidrio de borosilicato. Esta solución es satisfactoria cuando la celda tiene una constante entre 1 y 2 cm⁻¹.

Para celdas con otras constantes utilizar soluciones de otras concentraciones según Tabla 2510:I del Standard Methods (ver bibliografía).

Debe tenerse especial cuidado con soluciones de concentración menores a 0,001M, ya que pueden ser inestables por la influencia del dióxido de carbono.

Alternativamente se puede utilizar una solución de referencia comercial cuya conductividad este indicada en el envase, tanto para altas como bajas concentraciones.

Nota 1: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Previo a la medida, agitar la muestra.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Estandarización de la celda

10.1. Proceder de acuerdo al instructivo del equipo INE04.

10.2. Terminada la calibración del equipo, colocar la celda en un vaso de Bohemia con agua desionizada, agitar lentamente para conseguir un enjuague adecuado, y secar.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Enjuagar la celda de conductividad con tres porciones de la muestra a medir.

11.2. Ubicar la celda en la muestra asegurándose de cubrir los electrodos y el sensor de temperatura de la misma, de acuerdo a recomendaciones indicadas en el manual del equipo. No deben quedar retenidas burbujas de aire en la cavidad de medida. (mover suavemente la sonda para eliminar estas posibles burbujas).

11.3. Enjuagar la celda como en 10.2, y secar antes de analizar la próxima muestra

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Realizar la medición por duplicado en una de cada tres muestras por lo menos.

12.2. Para instrumentos con compensación automática de temperatura y lectura directa en $\mu\text{mho}/\text{cm}$ o unidades similares como por ejemplo: mS/cm o $\mu\text{S}/\text{cm}$ según corresponda, habiendo sido la lectura compensada automáticamente a 25 °C.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

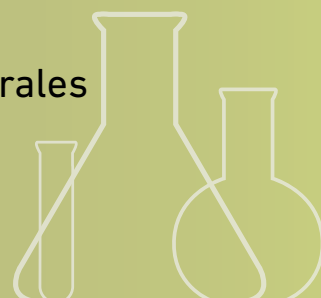
13.1. Realizar gráfico de control de precisión según Manual de Calidad Analítico (puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos normalizados).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2510 B Conductivity Laboratory Method pp. 2-54 a 2-55.

1011UY

Determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.



Método titulométrico con EDTA

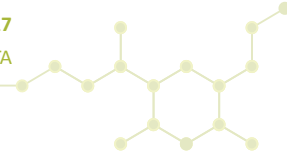
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanzas (INE15, INE 16).
- 2.6. Ruta de análisis (RFQ 08).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La dureza total se define como la suma de concentración de iones calcio y magnesio, expresados como carbonato de calcio (CaCO_3), en mg/L.
- 3.2. Los iones calcio y magnesio forman complejos estables con etilendiaminotetra-acetato disódico (EDTA). El punto final de la titulación es detectado por el viraje de color del indicador “Negro de Eriocromo-T”, el cual presente un color rosado en presencia de calcio y magnesio en forma libre y un color azul cuando los cationes están formando complejos con EDTA.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.
- 4.2. Máscara con filtro para solventes orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Algunos iones de metales pueden causar desvanecimiento del color o producir diferentes puntos finales en la titulación o por consumición estequiométrica del EDTA. Reducir estas interferencias adicionando inhibidores antes de la titulación (Tabla 1). Si las concentraciones de los metales presentes son mayores, se debe determinar calcio y magnesio por un método que no utilice EDTA y se puede obtener la dureza por cálculo.
- 5.2. La materia orgánica suspendida o coloidal puede interferir también con el punto final de la determinación. Se debe eliminar esta interferencia evaporando la muestra en un baño de vapor y luego calentar en mufla a 550 °C hasta oxidar por completo la materia orgánica. Disolver el residuo en 20 mL de ácido clorhídrico 1 N (HCl), neutralizar a pH 7 con hidróxido de sodio 1 N (NaOH), y continuar de acuerdo con el procedimiento general.

| Sustancia de Interferencia | Máxima Concentración de Interferencia (mg/L) | |
|----------------------------|--|--------------|
| | Inhibidor I | Inhibidor II |
| Aluminio | 20 | 20 |
| Bario | * | * |
| Cadmio | * | 20 |
| Cobalto | > 20 | 0,3 |
| Cobre | > 30 | 20 |
| Hierro | > 30 | 5 |
| Plomo | * | 20 |
| Manganeso | * | 1 |
| Níquel | > 20 | 0,3 |
| Estroncio | * | * |
| Zinc | * | 200 |
| Polifosfato | | 10 |

Tabla 1: Máximas concentraciones de sustancias de interferencia permisibles con inhibidores

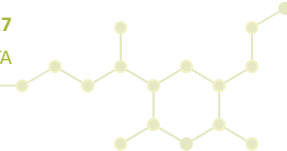
Nota: Tabla basada en porciones de muestras de 25 mL diluidas a 50 mL. (*) Titulados como dureza

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 200 mL de la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Preservar con ácido sulfúrico o nítrico a pH < 2 y refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). La muestra es estable durante 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Matraz Erlenmeyer de más de 100 mL o vaso de Bohemia del mismo volumen.
- 7.2. Buretas de 10,0 mL y 25,0 mL, graduadas en 0,1 mL.
- 7.3. Pipetas automáticas de 1,00 mL y de 10,00 mL
- 7.4. Matraz aforado de 1000 mL
- 7.5. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.6. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.7. Agitador magnético
- 7.8. Barras magnéticas
- 7.9. Espátula metálica
- 7.10. Mortero
- 7.11. Mechero
- 7.12. Mufla para trabajar a 550 °C
- 7.13. Cápsulas de porcelana
- 7.14. Probetas



8. REACTIVOS

- 8.1. Solución buffer: disolver 1,179 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado (EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) y 780 mg de sulfato de magnesio heptahidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Nro. CAS 10034-99-8) o 644 mg de cloruro de magnesio hexahidrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ Nro. CAS 7791-18-6) en 50 mL de agua desionizada. Agregar a ésta solución 16,9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) y 143 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6) concentrado. Mezclar y diluir a 250 mL con agua desionizada. Almacenar en botella de plástico, esta solución es estable un mes.
- 8.2. Indicador negro de eriocromo -T (NET): mezclar 0,5 g de NET con 100 g de cloruro de sodio (NaCl) y pulverizar en mortero.
- 8.3. Solución titulante de EDTA 0,01M: disolver 3,723 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado (EDTA) en agua desionizada y diluir a 1000 mL. Guardar en botella de plástico. Titular contra solución patrón de calcio.
- 8.4. Solución patrón de calcio 1 g/L $CaCO_3$: pesar 1,000g de $CaCO_3$ anhidro seco en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Agregar lentamente solución de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 1+1 hasta que todo el carbonato de calcio se haya disuelto. Agregar 200 mL de agua desionizada y hervir 5 minutos para eliminar completamente el CO_2 . Enfriar, agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar al color intermedio naranja agregando solución 3 N de NH_4OH o solución 1+1 de HCl según corresponda. Transferir cuantitativamente y enrasar a 1000 mL en matraz aforado con agua desionizada.
- 8.5. Inhibidor I: Ajustar las muestras ácidas a pH 6 o mayor con buffer o NaOH 0,1 N. Adicionar 250 mg de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en polvo. Adicionar suficiente buffer para ajustar el pH a $10,0 \pm 0,1$. Tener precauciones en el uso de cianuro de sodio por ser extremadamente tóxico.
- 8.6. Inhibidor II: Disolver sulfuro de sodio (5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4 o 3,7 g de $Na_2S \cdot 5H_2O$) en 100 mL de agua desionizada. Este inhibidor se deteriora en contacto con el aire. Se produce un precipitado de sulfuro cuando altas concentraciones de metales pesados están presentes, oscureciendo el punto final. Emplear 1 mL en la titulación de la muestra.
- 8.7. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS1310-73-2) 0,1 N
- 8.8. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Realizar la titulación dentro de los cinco minutos luego de agregar la solución buffer. Se debe descartar la solución buffer si al adicionar a la muestra 1 o 2 mL de buffer, no se alcanza el pH deseado ($pH 10,0 \pm 0,1$) en la muestra.
- 9.2. Para muestras con una dureza menor a 5 mg/L (aguas blandas o aguas naturales), se debe aumentar el volumen de muestra para la titulación (100 a 1000 mL), adicionar proporcionalmente a su vez, una mayor cantidad de inhibidor si fuera necesario, indicador y solución buffer. Se debe a su vez realizar un blanco, con el mismo volumen de muestra así como con las mismas cantidades adicionadas de inhibidor, indicador y solución buffer. Utilizar en este blanco el volumen de EDTA adicionado en la muestra.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Titulación de la solución de EDTA: tomar 10 mL de la solución patrón de $CaCO_3$ y llevar a 50 mL con agua desionizada. Agregar 1,0 mL de solución buffer.

Nota 2: la toma de la solución de $CaCO_3$ debe realizarse con pipeta aforada de 10 mL o en la balanza de precisión 0,01 g.

- 10.2. Agregar una punta de espátula de NET. Titular con la solución EDTA, lentamente y agitando continuamente hasta viraje de color de la solución de color rosado a azul.

10.3. La normalidad del EDTA se determina según:

$$N = \frac{C \times T}{G}$$

donde:

N: corresponde a mg de CaCO₃ equivalentes a 1000 mL de EDTA.

C: corresponde a mg/L CaCO₃ de la solución estándar de carbonato de calcio (8.4)

T: corresponde a Toma en mL de solución de carbonato de calcio.

G: corresponde a Gasto en mL de EDTA utilizados en la valoración

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas:

11.1. La metodología debe realizarse a temperatura ambiente, en muestras frías el cambio de color se vuelve muy lento y en aguas calientes la descomposición del indicador es problemática.

11.2. El pH especificado (10 ± 0,1) puede provocar precipitación de CaCO₃ a pesar de que el reactivo titulante disuelve lentamente este precipitado.

Métodos para reducir la precipitación:

- 1) Diluir la muestra con agua desionizada de forma de reducir la concertación de CaCO₃ si en una dilución 1+1 se produce precipitación utilizar 2) o 3).
- 2) Si se conoce la dureza o es determinada por una titulación preliminar, adicionar 90 % o más del reactivo titulante a la muestra antes de ajustar el pH con el buffer.
- 3) Acidificar la muestra y agitar con agitador magnético por 2 minutos de forma de eliminar el CO₂ antes de ajustar el pH. Determinar la alcalinidad para indicar la cantidad de ácido a adicionar.

Análisis de la muestra:

11.3. Tomar en un Erlenmeyer un volumen de muestra que requiera más de 15 mL de gasto de la solución titulante EDTA y se complete la titulación dentro de los 5 minutos siguientes a la adición del buffer.

11.4. Agregar 1 ó 2 mL de solución buffer y una punta de espátula de NET.

11.5. Titular con solución de EDTA lentamente y agitando con agitador magnético, hasta viraje de color de la solución de rosado a azul.

Nota 3: Si no se obtiene un punto final definido en cuanto a coloración, esto usualmente indica que debe adicionarse un inhibidor en este momento o que el reactivo indicador se ha deteriorado.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La Dureza Total se determina según:

$$\text{Dureza Total, mg CaCO}_3 = \frac{N \times G}{T}$$

donde:

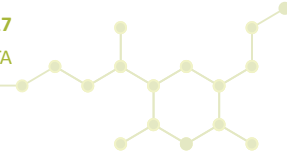
N corresponde a mg de CaCO₃ equivalentes a 1000 mL de EDTA.

T corresponde a Toma en mL de muestra (se considera densidad de la muestra 1 g/mL).

G corresponde a Gasto en mL de EDTA utilizados en la valoración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar 10 mL de la solución de "Control de Dureza Total - Dureza Calcio" (elaborada por el Responsable de Calidad o quien designe) simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).



13.2. **Control de la precisión:** se debe realizar un análisis por duplicado de una de cada tres muestras, mínimo una por serie de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos normalizados correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

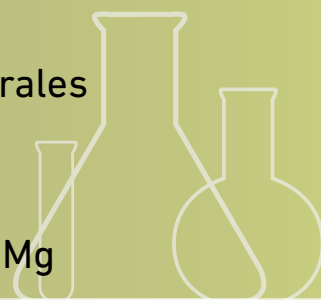
14.1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition, 2005. A y C pp.2-37 a 2-39. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard method for examination of water and wastewater, 22nd edn. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método Hardness Introduction 2340 A pp 2-44 2340 C EDTA Titrimetric method 2-44 a 2-47.



1012UY

Determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.

Cálculo de dureza a partir de valores de Ca y Mg



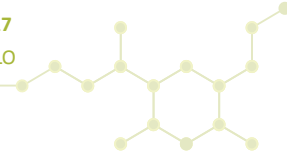
Elaborado - S. Andrade

Modificado - No aplica

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de Calcio. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama.” (3107UY)
- 2.6. Procedimiento: “Determinación de Magnesio. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama.” (3139UY)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La dureza total se define como la suma de concentración de Calcio y Magnesio, expresados ambos como carbonato de calcio en mg/L.
- 3.2. Originalmente, la dureza del agua se entendía como una medida de la capacidad del agua para precipitar jabón, siendo los iones calcio y magnesio los principales responsables de esto. Manteniendo la práctica habitual, es que dureza se define como la suma de concentraciones de calcio y magnesio, ambas expresadas como carbonato, en mg/L. Los iones calcio y magnesio se determinan según las referencias 3.4 y 3.5 respectivamente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. No aplica

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. No aplica

8. REACTIVOS

- 8.1. No aplica

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No aplica

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica

11. ANALISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. No aplica

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Una vez obtenido los valores de concentración de calcio y magnesio según referencia 2.5 y 2.6 respectivamente, realizar el siguiente cálculo:

$$\text{Dureza Total, mg CaCO}_3/\text{L} = 2,497 \times [\text{Ca mg/L}] + 4,118 \times [\text{Mg mg/L}]$$

donde:

[Ca mg/L]: corresponde a la concentración de Calcio expresada en mg/L

[Mg mg/L]: corresponde a la concentración de Magnesio expresada en mg/L

2,497: corresponde al factor de conversión de mg/L de Ca, a mg/L de CaCO₃.

4,118: corresponde al Factor de conversión de mg/L de Mg, a mg/L de CaCO₃.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2340 A Hardness Introduction pp. 2-44.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th edition, 2012. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2340 B Hardness by Calculation pp. 2-44.

1016UY

Determinación de pH en suelo y residuos.



Método electrométrico

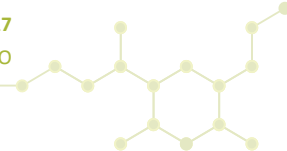
Elaborado - R. Gálvez

Modificado - No aplica

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de pH electrométricamente, en muestras de suelo, residuos sólidos, lodos y líquidos no acuosos.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RFQ 26)
- 2.6. Instructivos de uso del analizador de iones (INE 98)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La muestra es mezclada con agua desionizada, y la determinación de pH se realiza en la fase líquida sobrenadante obtenida.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes descartables

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Muestras con muy bajo o muy alto pH pueden dar medidas incorrectas. Por ejemplo para $\text{pH} > 10$, la determinación es menor. Soluciones muy ácidas, con un pH verdadero menor a 1 puede dar valores de medición mayores.
- 5.2. La fluctuación de la temperatura provoca errores en la determinación.
- 5.3. Una limpieza insuficiente del electrodo entre muestras puede producir errores.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en bolsa de polietileno con cierre hermético e impermeable. Muestra mínima 200 g; refrigerada $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 6.2. La muestra debe ser analizada lo antes posible (15 minutos).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Agitador magnético.
- 7.2. Pastillas magnéticas.
- 7.3. Analizador de iones.
- 7.4. Electrodo combinado para determinación de pH, o electrodo de pH y electrodo de referencia.
- 7.5. Termómetro con precisión a $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o electrodo de pH con corrector de temperatura.
- 7.6. Balanza de resolución 0,1 g.
- 7.7. Matraz de borosilicato de 250 mL mínimo, que tengan tapa o la posibilidad de ser mantenidos cerrados.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.2. Soluciones buffer: Se puede utilizar soluciones comerciales; de lo contrario soluciones preparadas según:
 - pH 4,00 a 20 °C Disolver 10,21 g de ftalato ácido de potasio ($C_8H_5KO_4$ Nro. CAS 877-24-7) en 1000 mL de agua desionizada (8.1). Dicho sólido debe ser secado por 2 h a $115\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
 - pH 6,88 a 20 °C Disolver 3,39 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), y 3,53 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 Nro. CAS 7558-79-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000 mL. El fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) debe ser secado por 2 h a $115\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
 - pH 9,22 a 20 °C Disolver 3,80 g tetraborato de sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ Nro. CAS 1303-96-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000 mL; dicho sólido, si es almacenado por mucho tiempo puede perder aguas de cristalización.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. En el caso que el pH determinado sea mayor a 10 unidades de pH, se deberá informar como estimado el valor obtenido, o de lo contrario contar con un electrodo específico para este tipo de medidas.
- 9.2. El secado del suelo puede influir en el valor de pH obtenido, principalmente en muestras que contengan sulfuros, el valor obtenido puede verse significativamente disminuido.

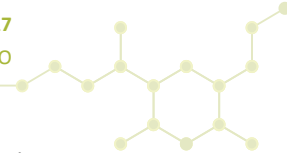
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Ajuste del analizador de iones según instructivo correspondiente, utilizando por lo menos dos soluciones buffer.
Repetir el ajuste con una nueva fracción si el valor obtenido de la solución buffer se aparta en más de 0,05 unidades de pH de su valor nominal.
- 10.2. Se debe controlar la temperatura a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, por lo que se recomienda la utilización de un baño para termostatar las muestras y los buffer.
- 10.3. Se debe constatar la calidad del agua que se utiliza.
- 10.4. Dejar registro en la ruta correspondiente:
 - Analizador de iones.
 - Número de inventario del electrodo utilizado.
 - Buffer utilizados.
 - Termómetro utilizado.
 - Slope obtenido en el ajuste.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación y determinación de pH

- 11.1. Llevar la muestra a temperatura ambiente; homogeneizarla en una bolsa de polietileno previo a la realización de la toma.
- 11.2. Realizar una mezcla 1 a 1 de muestra y agua desionizada. Experimentalmente se determina que la masa más adecuada es 50 g.
- 11.3. Colocar 50 g de muestra en un matraz de 250 mL, agregar 50 g de agua desionizada; cubrir, y agitar por 5 minutos. Diluciones adicionales están permitidas para muestras higroscópicas, con sales o matrices problemáticas. (Nota 1)
- 11.4. Dejar reposar la suspensión por 1 hora en el caso de suelos y 15 minutos para residuos, dentro del baño termostatzado, para permitir que la mayoría de las partículas suspendidas decanten, trasvasar el sobrenadante a un vaso de Bohemia. Si es necesario, se puede filtrar o centrifugar la muestra para realizar la medición.



- 11.5. Mantener el sobrenadante dentro del baño termostatzado hasta el momento de realizar la medición.
- 11.6. La medición de pH se deber realizar en el sobrenadante para establecer un buen contacto con la solución obtenida, siendo el volumen mínimo necesario para poder hacer la determinación unos 20 mL

Nota 2: Si el residuo o suelo es higroscópico y absorbe toda el agua desionizada, realizar una nueva toma utilizando una proporción de 1:2 o sea que por ejemplo para 50 g de muestra utilizar 100 g de agua desionizada; o un múltiplo de esto, continuar en el pto. 12.1.

Nota 3: Si el sobrenadante posee más de una fase, descartar la fase oleosa y realizar la medición en la fase acuosa, teniendo en consideración la limpieza adecuada del electrodo.

12. ANALISIS DE DATOS

- 12.1. Informar el resultado de la determinación con 0,1 unidades de pH.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control instrumental:** El porcentaje de slope obtenido debe ser mayor a 92 %.
- 13.2. **Control de la exactitud:** Luego de realizado el análisis verificar con una solución buffer comercial o preparada que el valor obtenido no se aparte más del 10 % de lo teórico.
- 13.3. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos normalizados correspondientes. (Según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.4. **Control de repetibilidad:** Establece la diferencia máxima que se puede obtener en los duplicados, según el rango de pH que se esté determinando.

| Rango de pH | Diferencias aceptables |
|------------------|------------------------|
| pH ≤ 7,00 | 0,15 |
| 7,00 < pH < 7,50 | 0,20 |
| 7,50 ≤ pH ≤ 8,00 | 0,30 |
| pH > 8,00 | 0,40 |

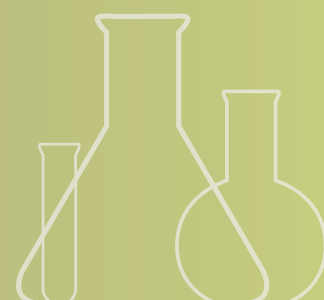
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. EPA – Method 9045D – Soil and waste pH
- 14.2. ISO 10390:2005 (E) Soil quality – Determination of pH



1017UY

Determinación de pH en aguas naturales
y efluentes líquidos.



Método potenciométrico

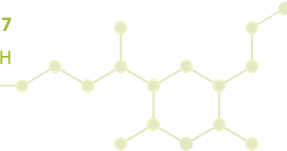
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físcoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98)
- 2.6. Ruta de análisis (RFQ 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El pH o la actividad del ión hidrógeno indica a una temperatura dada, la intensidad de las características ácidas o básicas del agua.
- 3.2. El pH se define como el logaritmo de la inversa de la actividad de los iones hidrógeno,

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

[H⁺] = actividad de los iones hidrógeno en mol/L.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad para la manipulación de la muestra.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El electrodo de vidrio generalmente no está sujeto a interferencias como color, turbidez, materia coloidal, oxidantes, reductores o alta salinidad, excepto para un “error de sodio”, que se da a pH mayores de 10. Este error se puede reducir usando un electrodo especial de bajo error de sodio.
- 5.2. La determinación de pH no puede ser llevada a cabo con exactitud en medios no acuosos, suspensiones, coloides o soluciones de alta fuerza iónica.
- 5.3. Recubrimientos de material graso o partículas pueden dificultar la respuesta del electrodo. Estos recubrimientos pueden ser removidos con una frotación muy suave o utilizando detergentes, seguido de un enjuague con agua destilada. Un tratamiento adicional es utilizar ácido clorhídrico (1 + 9) para remover cualquier película restante.
- 5.4. Las medidas de pH son afectadas por la temperatura en dos formas: por efectos mecánicos causados por cambios en las propiedades de los electrodos y por efectos químicos causados por cambios de equilibrios. En el primer caso las interferencias pueden ser controladas utilizando instrumentos que posean compensación de temperatura o calibrando el sistema electrodo-instrumento a la temperatura de las muestras. La segunda fuente de error depende de las muestras y no puede ser controlada, por lo cual se debe reportar la temperatura con cada medida de pH realizada.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. El análisis debería ser realizado en campo; si no es posible y debe ser realizado en el laboratorio, la muestra debe ser tomada sin cámara de aire, llenando completamente el recipiente de muestreo. La cantidad de muestra típica es de 250 mL, en recipiente de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C).
- 6.2. El valor de pH determinado en el laboratorio se informara como valor estimado; ya que el tiempo recomendado para la determinación del parámetro son 15 minutos a partir del momento de tomada la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (VersaStar ó similar).
- 7.2. Electrodo Orion 8102BNUWP con su solución de relleno Orion 810007 y solución de almacenamiento Orion 910001, o Electrodo Orión 9156DJWP de doble unión con cuerpo epoxi y gel de relleno.
- 7.3. Agitador magnético y barras magnéticas de agitación.
- 7.4. Vasos de Bohemia de 100 o 250 mL.
- 7.5. Papel tissue.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Soluciones buffers estándar de pH conocido, necesarias para calibrar el instrumento. Se pueden emplear soluciones adquiridas en forma comercial (estandarizadas) o prepararlas en el propio laboratorio, según Manual de Control de Calidad Analítica.

Nota 1: Almacenar en botella de polietileno en heladera, reemplazar las soluciones buffer cada 15 días (por posible crecimiento microbiano), o cuando la pendiente del analizador indique valores fuera del rango 90–110 %.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Tener el debido cuidado con el electrodo, no dejarlo fuera de la solución de almacenamiento por más de 2 minutos sin que sea empleado. Enjuagarlo con agua desionizada y secarlo con papel tissue siempre después de una medida tanto en la calibración o en la determinación.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

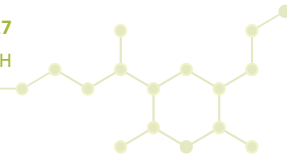
- 10.1. Se deben permitir que los buffers alcancen temperatura ambiente antes de comenzar la calibración.
- 10.2. Calibrar el electrodo según instrucciones del analizador de iones correspondiente al equipo. Verificar que el valor de la pendiente indicada en el analizador se encuentre entre 90 y 110 %, en caso contrario repetir la calibración antes de medir las muestras (de acuerdo a lo indicado en el manual del equipo en uso).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Permitir que la muestra llegue a temperatura ambiente y tomar un volumen de muestra suficiente para permitir sumergir el electrodo.
- 11.2. Establecer el equilibrio entre el electrodo y la muestra con agitación moderada para impartir homogeneidad y minimizar la entrada de dióxido de carbono (CO_2), (la velocidad de agitación debe ser igual a la utilizada para la homogeneización de los buffers durante la calibración).
- 11.3. En el caso de muestras con buffers o aquellas con alta fuerza iónica, permitir que el electrodo una vez limpio permanezca por un minuto en la muestra. Enjuagar y secar el electrodo. Sumergir en una nueva porción de muestra y luego realizar la lectura.
- 11.4. En caso de soluciones diluidas o pobremente buffereadas, el electrodo debe ser equilibrado sumergiéndolo en tres o cuatro porciones de muestra por unos minutos; y tomando una muestra nueva para la determinación.
- 11.5. Enjuagar el electrodo con agua grado reactivo y secar antes de analizar la próxima muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Unidades de pH de +/- 0,1, representa el límite de exactitud bajo condiciones normales, especialmente para la medida de agua y soluciones pobremente buffereadas. Por esta razón, informar valores a la unidad más cercana a 0,1 unidades de pH.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Realizar la medición por duplicado e informar el promedio de ambos valores.
- 13.2. Realizar gráfico de control. La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos normalizados.
- 13.3. Registrar en un gráfico el valor de la pendiente obtenida del equipo.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-H+ B Electrometric Method pp. 4-92 a 4-96.
- 14.2. Manual de electrodo de pH, Orion



1018UY

Determinación de la concentración de sílice reactiva al molibdato en aguas naturales.



Método colorimétrico.

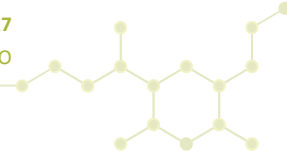
Elaborado - F. Lauber

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinar la concentración de sílice reactiva al molibdato en aguas naturales, en concentraciones entre 0,92 a 75 mg SiO₂/L. El límite de detección es de 0,18 mg SiO₂/L. También es aplicable a aguas salobres o salinas.
- 1.2. Se denomina sílice reactiva a la sílice que reacciona con molibdato para formar ácido molibdosilícico.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16 A, INE 16 B)
- 2.6. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22)
- 2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 14)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El molibdato de amonio a pH 1,2 aproximadamente, reacciona con sílice y fosfatos presentes formando heteropoliácidos. El ácido oxálico es adicionado para destruir el ácido molibdofosfórico pero no el ácido molibdosilícico. Aunque se conozca la ausencia de fosfatos, la adición del ácido oxálico es un paso necesario.
- 3.2. La intensidad del color amarillo formado es proporcional a la concentración de sílice reactiva al molibdato, la cual se mide en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 410 nm. La concentración se determina mediante una curva de calibración.
- 3.3. La sílica no reactiva al molibdato puede ser convertida en sílica reactiva por medio de calentamiento o por medio de una fusión alcalina. Si se realiza este paso debe ser aclarado al informar el resultado.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Trabajar en campana de extracción de gases para la preparación de ácido clorhídrico diluido.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interfieren en la medida: taninos, altas concentraciones de hierro, color, turbidez y sulfuros.
- 5.2. El tratamiento con ácido oxálico elimina la interferencia por fosfatos, y disminuye la interferencia con los taninos.
- 5.3. El color producido por el método es afectado por altas concentraciones de sales, con muestras de agua salada, la intensidad del color amarillo decrece entre un 20 y un 35 %.
- 5.4. Cuando las muestras presentan alta fuerza iónica y son analizadas por este método se deben utilizar estándares de silicio para la curva con aproximadamente la misma fuerza iónica (ver referencias de bibliografía).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar 100 mL de la muestra en recipientes de vidrio o de polietileno, polipropileno, u otro plástico. Mantenerla refrigerada a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C), como máximo 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro o colorímetro, con longitud de onda a 410 nm, con paso de luz de 1 cm.
- 7.2. Celda: tubos de 25 mL de capacidad y de 2,5 cm de diámetro con tapa.
- 7.3. Balanza de resolución de 0,01 g.

- 7.4. Balanza de resolución de 0,001 g.
- 7.5. Pipeta automática de rango entre 200 –1000 μL , con tips correspondientes.
- 7.6. Pipeta automática de rango entre 1 y 10 mL, con tips correspondientes.
- 7.7. Matraz aforado de 1000 mL.
- 7.8. Probetas de 100 mL.
- 7.9. Matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- 7.10. Vasos de Bohemia de 250 mL.

8. REACTIVOS

Nota 1: Almacenar todos los reactivos en frascos de plástico. Utilizar lotes de reactivos bajos en silicatos.

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 N:
Pesar 4 g de NaOH y llevar a volumen (100 mL) con agua desionizada.
- 8.3. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 1 + 1:
Diluir en vaso de bohemia 100 mL de HCl concentrado en 100 mL de agua desionizada. Esperar a que no se desprenda más gas, almacenar en frasco de plástico. Todo este proceso debe ser realizado en la campana de extracción.
- 8.4. Solución de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 12054-85-2):
Disolver 10 g de molibdato de amonio tetrahidratado en agua desionizada, con agitación y suave calentamiento. Diluir a 100 mL. Filtrar si es necesario. Ajustar el pH entre 7-8, con NaOH o hidróxido de amonio (NH_4OH) libre de sílica.

Nota 2: Si el pH no es ajustado, se formará un precipitado.

- 8.5. Solución de ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 6153-56-6):
Disolver 7,5 g de ácido oxálico mono-hidratado o 8,75 g de ácido oxálico di-hidratado en agua desionizada y diluir a 100 mL.
- 8.6. Solución stock de sílice (aprox. 1 g de SiO_2/L):
Disolver 4,73 g de metasilicato de sodio nanohidratado ($\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 13517-24-3) en agua desionizada y diluir a 1000 mL en matraz aforado. Estandarizar esta solución contra la solución de referencia de 1000 mg de Si /L. 8.7. Solución estándar de trabajo de 100 mg de SiO_2/L (Nro. CAS 7631-86-9):
Diluir 10,00 mL de la solución stock en 1000 mL de agua desionizada; 1,00 mL = 10,0 μg SiO_2
Calcular la concentración exacta a partir de la concentración stock. Almacenar en frasco de plástico bien cerrado. Se puede emplear como alternativa una solución patrón comercial.
- 8.8. Solución de control de silicatos: Ver preparación en el manual de Calidad Analítico- Laboratorio Ambiental de DINAMA. Se puede emplear como alternativa una solución patrón comercial.

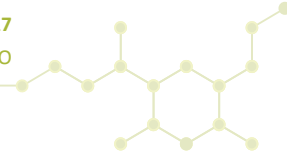
Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. La muestra a analizar debe tener el menor contacto posible con el vidrio.
- 9.2. Todo el material de vidrio debe encontrarse en óptimas condiciones de limpieza. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar una curva de calibración con una serie de aproximadamente seis estándares a partir de la solución de trabajo de 100 mg SiO_2/L , dentro del rango de linealidad de la técnica.



10.2. La curva de calibración puede ser preparada con material aforado o directamente en los tubos o celdas de lectura, registrando los pesos de las tomas de solución de trabajo utilizando balanza de resolución de 0,001 g y del volumen final, para cada punto de la curva.

10.3. Para un volumen final de 25 mL en los tubos, realizar la siguiente toma:

| Estándar (mg SiO ₂ /L)* | Toma en g de Solución Trabajo |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 0,00 |
| 0,5 | 0,10 |
| 1 | 0,20 |
| 2 | 0,50 |
| 3 | 0,75 |
| 5 | 1,5 |
| 10 | 2,4 |
| 15 | 3,5 |

* el primer punto de la curva corresponde al límite de cuantificación determinado.

10.4. Determinar la absorbancia cero del espectrofotómetro con un blanco de agua 8.1, y leer las absorbancia de todas las soluciones estándares a 410 nm. (Abs 0)

10.5. Agregar en rápida sucesión 0,5 mL de ácido clorhídrico (1 + 1) y 1,0 mL de molibdato de amonio. Tapar y mezclar por inversión por lo menos 6 veces y esperar de 5 a 10 minutos.

10.6. Luego agregar 1,0 mL de solución de ácido oxálico y agitar vigorosamente. Leer la absorbancia a 410 nm, entre los 2 y 15 minutos. (Abs 1)

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Desarrollo de color:

11.1. Tomar 25 mL de muestra o una alícuota de la misma y llevar a 25 mL. Realizar la toma y la dilución en peso en balanza de resolución de 0,001 g.

Nota 4: Volumen mínimo de muestra para realizar la dilución en el propio tubo de 5 mL; aceptando una dilución máxima de 5 veces.

11.2. Determinar la absorbancia cero del espectrofotómetro con un blanco de agua destilada, y leer las absorbancia de todas las soluciones muestras a 410 nm. (Abs 0)

11.3. Proceder de la misma forma que en los puntos 10.5 y 10.6.

Corrección por color o turbidez:

Preparar un blanco especial para las muestras que necesiten dicha corrección. Tomar dos porciones idénticas de la muestra. A una porción adicionar todos los reactivos tal como se establece en los puntos 11.2 y 11.3. A la otra porción adicionar ácido clorhídrico y ácido oxálico, pero no el molibdato de amonio.

Ajustar el cero del espectrofotómetro con la muestra blanco que no contiene el molibdato de amonio, antes de leer las muestras tratadas con molibdato de amonio.

Nota 5: Para la detección de presencia de sílice no reactiva al molibdato de amonio, digerir la muestra con NaHCO₃, antes de la determinación de color. Esta digestión puede que no sea suficiente para convertir toda la sílice no reactiva al Molibdato de Amonio a la forma reactiva. Para la realización de la digestión, referirse a la bibliografía.

Si se realiza la digestión, debe ser declarado en el informe de resultado de la muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1.

$$\text{Abs}_{(\text{estándar o muestra})} = \text{Abs 1} - \text{Abs 0}$$

12.2. La curva de calibración está representada por la siguiente curva lineal:

$$\text{Abs}_{\text{estándar}} = a \times (\text{mg SiO}_2/\text{L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente ordenada en el origen respectivamente

12.3. La concentración de sílice se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Sílice, mg SiO}_2/\text{L} = \frac{(\text{Absmuestra} - b) \times \text{FD}}{a}$$

donde:

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Para 1 cada 5 muestras de aguas naturales (mínimo 1 por batch), realizar la medición por duplicado e informar el promedio de ambos valores. Se acepta hasta 8,4 % desviación estándar relativa; hasta tener un grafico de Control para Precisión.

13.2. **Control de exactitud:** Analizar la solución de "Control de Silicato" simultáneamente con las muestras. Se puede también emplear como solución de control una solución comercial de referencia. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Rango de aceptación: 85-115 % de recuperación; hasta contar con un grafico de control para la Exactitud

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar al menos 1 cada 5 muestras, o por lo menos una muestra en el batch, con la solución "Control de Silicato". La cantidad adicionada, deberá brindar una concentración correspondiente a la mitad de la curva o menor. Se deberá utilizar una solución de concentración tal que evite diluir la muestra con la adición (máximo 5 % en volumen). Rango de aceptación: 85 - 115 % de recuperación; hasta contar con un grafico de control para la recuperación de la fortificación.

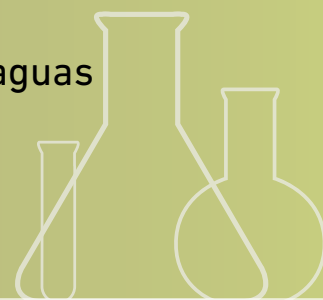
Nota 4: Cuando los resultados no se encuentren dentro de los rangos establecidos se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis. (Según Manual de Control de Calidad Analítico)

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-SiO₂ A Introduction y 4500 -SiO₂ C Molybdosilicate Method pp. 4-165 a 4-169.

1019UY

Determinación de sólidos sedimentables en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.



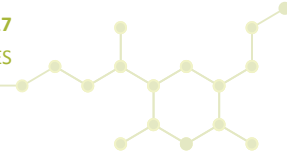
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos sedimentables en aguas superficial y residuales domésticas e industriales.

El término sólidos sedimentables se aplica a todos los materiales sedimentables presentes que son capaces de sedimentar en un cono Imhoff, en un período de tiempo definido. El límite de cuantificación es de 0,5 mL/L

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RFQ 16)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se homogeniza la muestra y se coloca en un cono Imhoff. Se lee el volumen de sedimento a los 60 minutos.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Muestras muy cargadas de sólidos dificultan la lectura, así como muestras de color oscuro.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Se recogen las muestras en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro.
- 6.2. Se conserva la muestra a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante un período de 24 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Cono Imhoff graduado de 1000 mL de capacidad (de vidrio o de plástico).
- 7.2. Varilla de vidrio.

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Se recomienda iniciar el análisis lo antes posible para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.
- 9.2. Realizar el análisis en 24 horas.
- 9.3. Homogeneizar agitando por inversión repetidas veces la muestra previo a su colocación en el cono Imhoff.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Se agita la muestra por inversión.
- 11.2. Se coloca un litro de la muestra en un cono Imhoff.

11.3. A los 45 minutos se agita la muestra con una varilla de vidrio, raspando las paredes internas del cono.

11.4. A los 60 minutos se realiza la lectura.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Los resultados se expresan en mL de sólidos sedimentables /L de muestra observado a los 60 minutos.

12.2. El límite de cuantificación se encuentra entre 0,1 y 1 mL/L, de acuerdo a lo que permita el la graduación del cono empleado.

12.3. En caso de que el material presente en la muestra no sedimente en forma compacta, por ejemplo presentando flóculos o acúmulos, dejarlo registrado en observaciones en el informe de resultados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

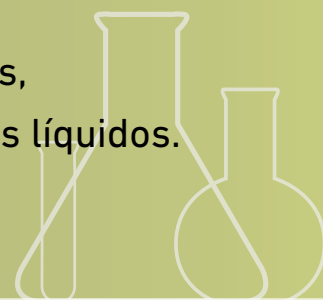
13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2540 A Solids Introduction y F Settleble Solids pp. 2-62 al 2 - 63 y 2-67 al 2-68

1020UY

Determinación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles en aguas naturales y efluentes líquidos.



Método gravimétrico

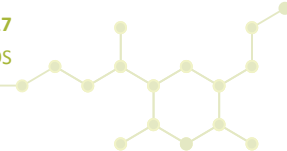
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles en aguas naturales y efluentes líquidos (industriales y domésticos).
- 1.2. El término Sólidos Suspendidos se aplica a la parte de los sólidos totales retenida por un filtro de fibra de vidrio.
- 1.3. El término Sólidos Suspendidos Totales se aplica a los residuos de material que quedan en un filtro después de la evaporación en estufa a 103 - 105 °C. Los Sólidos Suspendidos Fijos corresponden a los residuos remanentes del incinerado a 550 °C y los Sólidos Suspendidos Volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 °C (que dan una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en la muestra).
- 1.4. Mediante este procedimiento se pueden determinar los sólidos suspendidos desde 9,2 mg/L hasta 2,0E+04 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RFQ 17)
- 2.6. Instructivo de equipo bomba de vacío (INE 02)
- 2.7. Instructivo de equipo mufla (INE 27)
- 2.8. Instructivo de estufa 104 °C (INE 42)
- 2.9. Instructivo de balanza (INE 93)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La muestra se filtra en filtro estándar de fibra de vidrio, se seca hasta peso constante a 103-105 °C, para determinar sólidos suspendidos totales, y luego se coloca en mufla a 550 °C hasta peso constante para la determinación de sólidos suspendidos fijos y volátiles.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica y guantes descartables.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Se eliminan de la muestra las partículas gruesas flotantes o los aglomerados sumergidos de materiales no homogéneos, si se decide que su inclusión no es deseable en el resultado final.
- 5.2. Se debe disminuir el volumen de muestra a filtrar para que el material retenido proporcione un residuo no mayor a 200 mg.
- 5.3. Las muestras ricas en sólidos disueltos exigen un lavado meticuloso del filtro luego del filtrado de la muestra, para asegurar la eliminación de todo el material disuelto.
- 5.4. Las muestras ricas en sólidos suspendidos pueden obstruir el filtro antes de terminar el filtrado y producir resultados altos debido a una cantidad excesiva de material coloidal capturado en el filtro obturado. En ese caso se recomienda disminuir el tamaño de la muestra, repitiendo el análisis.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Se recogen las muestras en frascos de plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro. Para muestras de aguas naturales recoger aproximadamente 2000 mL; para muestras de efluentes líquidos es suficiente un volumen menor.
- 6.2. Se conserva la muestra a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante un período de siete días como máximo. De preferencia analizar dentro de las 24 horas para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Estufa para operar a 103 - 105 °C
- 7.2. Mufla para operar a 550 °C
- 7.3. Desecador provisto de un desecante con un indicador de color.
- 7.4. Balanza de resolución de 0,0001 g
- 7.5. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 1000 mL
- 7.6. Bomba de vacío
- 7.7. Pinzas de metal para manipular los crisoles
- 7.8. Pinzas de metal para manipular los filtros
- 7.9. Probetas de vidrio de 50, 100, 250 y 500 mL de capacidad
- 7.10. Matraz aforado de 250 mL
- 7.11. Pipeta automática de 1 - 10 mL
- 7.12. Crisoles o cápsulas de porcelana
- 7.13. Filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño de poro 2,0 µm o menor
- 7.14. De acuerdo a bibliografía de referencia los filtros habilitados son: Whatman grade 934AH; Gelman type A/E; Millipore type AP40; E-D Scientific Specialties grade 161; Enviromental Express Pro Weigh; u otro que proporcione resultados equivalentes (ejemplo: Advantec GC50)

8. REACTIVOS

- 8.1. Silica gel con indicador de color para determinar la existencia de hidratación.
- 8.2. Solución Control de Sólidos Suspendidos: suspensión de celulosa microcristalina (500 mg/L): Ver preparación en el manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA (PGC04).
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Es importante secar los residuos a la temperatura indicada debido a que ésta puede influir considerablemente en el resultado.
- 9.2. Antes de filtrar la muestra se debe homogenizar bien agitando el recipiente por inversión reiteradas veces.
- 9.3. Se debe pesar el filtro con el crisol inmediatamente después de sacarlo del desecador para evitar un cambio de peso al exponerlos al ambiente por hidratación.
- 9.4. Tener especial cuidado con el estado de los desecadores (juntas, cierres, color de la sílica).

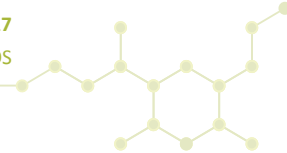
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación del filtro

- 11.1. Se coloca un filtro de fibra de vidrio en el portafiltro de un embudo Büchner, conectado a un frasco de succión y al sistema de vacío.
- 11.2. Se enciende el sistema de vacío y se lava el filtro con tres volúmenes sucesivos de aprox. 20 mL de agua desionizada.
- 11.3. Se continúa la succión hasta eliminar toda el agua. Se apaga la bomba. Se retira cuidadosamente el filtro del embudo con una pinza y se transfiere a un crisol o una cápsula de porcelana que sirve como portador del filtro.
- 11.4. Si se va a determinar únicamente Sólidos suspendidos totales: Se seca el filtro dentro del crisol en la estufa a 103 - 105 °C durante el tiempo necesario (ver nota). Se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de precisión de 0,1 mg.



Nota 1: Se repite el ciclo de secado, colocación en desecador y pesada hasta obtener un peso constante o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % de la pesada previa, o una diferencia de hasta 0,5 mg. Cada laboratorio debe evaluar los tiempos de la muestra en la estufa en que se aseguran estas condiciones.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante de secado en estufa para sus condiciones y equipos en 1 hora.

- 11.5. Si se van a determinar Sólidos suspendidos fijos y volátiles, se seca el filtro dentro del crisol en la mufla a 550 °C durante el tiempo necesario (ver nota), se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de precisión de 0,1 mg.

Nota 2: Se repite el ciclo de secado, colocación en desecador y pesada hasta obtener un peso constante o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % de la pesada previa, o una diferencia de hasta 0,5 mg. Cada laboratorio debe evaluar los tiempos en la mufla en que se aseguran estas condiciones.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante del filtro de luego de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 1 hora.

- 11.6. Almacenar los crisoles con los filtros ya preparados en el desecador, hasta su posterior utilización.

Procesamiento de la muestra

- 11.7. Se pesa el filtro (previamente preparado) en el crisol con una precisión de 0,1 mg inmediatamente antes de usar. Se registra en la ruta de análisis como P1.

- 11.8. Se coloca el filtro de fibra de vidrio en el portafiltro del embudo. Se moja el filtro con un pequeño volumen de agua desionizada. Se agita la muestra repetidas veces por inversión y se toma un volumen adecuado de la misma. Para aguas naturales por características de las mismas los volúmenes a filtrar son mucho mayores que para el caso de las muestras provenientes de efluentes industriales. Para estos últimos filtrar al menos 20 mL (menos de esta cantidad no se considera muestra representativa). En caso que el cliente solicite el análisis de sólidos suspendidos en una muestra que filtra menos de 20mL, informar estimado y con la siguiente observación: "Características de la muestra no permiten filtrar el volumen mínimo requerido por la técnica de sólidos suspendidos".

Nota 3: Se elige un volumen de muestra que proporcione un residuo de entre 2,5 y 200 mg de residuo seco. Si se requiere más de 10 minutos para filtrar la muestra, se descarta el filtro y deberá filtrarse un volumen menor de muestra.

- 11.9. Después de la filtración de la muestra, se lava el filtro con agua desionizada.

Nota 4: en muestras muy cargadas no lavar con más de 10 mL de agua porque el filtro puede saturarse.

- 11.10. Se retira cuidadosamente el filtro del embudo con ayuda de una pinza y se transfiere al crisol de porcelana.

- 11.11. Se seca el filtro con el residuo en el crisol en la estufa a 103–105 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante, luego se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de precisión de 0,1 mg. Se registra en la ruta de análisis como P2.

Nota 5: Cada laboratorio debe determinar el tiempo necesario de secado para obtener peso constante, o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % del peso anterior o una diferencia de hasta 0,5 mg.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante de secado en estufa para sus condiciones y equipos en 2 horas tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.

- 11.12. Se coloca el filtro con el residuo en el crisol en la mufla a 550 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante luego se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de precisión de 0,1 mg. Se registra en la ruta de análisis como P3.

Nota 6: Cada laboratorio debe determinar el tiempo necesario de incineración para obtener peso constante, o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % del peso anterior o una diferencia de hasta 0,5 mg.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 1 hora tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Se calcula la concentración de los sólidos suspendidos en la muestra por medio de las siguientes ecuaciones:

Sólidos Suspendidos Totales, mg/L = $(P_2 - P_1) \times 1000000 / V$

Sólidos Suspendidos Fijos, mg/L = $(P_3 - P_1) \times 1000000 / V$

Sólidos Suspendidos Volátiles, mg/L = $(P_2 - P_3) \times 1000000 / V$

donde:

P1: corresponde al peso del filtro y el crisol en gramos (g).

P2: corresponde al peso del filtro más el residuo y el crisol en g luego de secado en estufa.

P3: corresponde al peso del filtro más el residuo y el crisol en g luego de incinerado en mufla.

V: corresponde al volumen de la muestra en mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado cada 3 muestras, o al menos 1 duplicado por serie de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control de rangos normalizados correspondiente (según Manual de Control de Calidad Analítico). Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico

13.2. **Control de la exactitud:** El día del análisis realizar una dilución 1/10 de la solución "Control de Sólidos Suspendidos" (500 mg/L de celulosa microcristalina). Filtrar 250 mL y procesar simultáneamente con las muestras. Verificar que el porcentaje de recuperación esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente (según Manual de Control de Calidad Analítico). De lo contrario, revisar el procedimiento y si corresponde repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

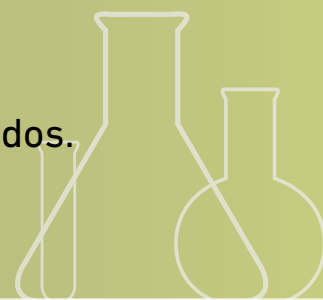
13.3. **Control de Blancos:** Incluir cada día de análisis 1 blanco, filtrando 500 mL de agua desionizada a través de un filtro. Procesar simultáneamente con las muestras. El valor de sólidos suspendidos obtenido debe ser menor que el LC de la metodología. Si es igual o mayor repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd. Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2540 D Total suspended solid dried at 103-105 °C y 2540 E Fixed and volatile solids ignited at 550 °C pp. 2-66 a 2-67.

1021UY

Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles en aguas naturales, y efluentes líquidos.



Método gravimétrico

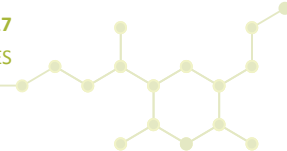
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - G. Pistone

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos totales, fijos y volátiles en agua naturales y efluentes líquidos.
- 1.2. El término sólidos totales se aplica a los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación en estufa a 103 - 105 °C. Los sólidos fijos corresponden a los residuos sólidos remanentes del calentamiento a 550 °C y los sólidos volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 °C.
- 1.3. Mediante este procedimiento se puede determinar los sólidos totales en un rango de 24 mg/L a 20.000 mg/L, de acuerdo a lo indicado por el método de referencia.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RFQ 15)
- 2.6. Instructivos de uso de muflas (INE 27, INE 33)
- 2.7. Instructivos de uso de baños de agua (INE 32, INE 81, INE 37)
- 2.8. Instructivos de uso de estufa (INE 42)
- 2.9. Instructivos de uso de balanzas (INE 93, INE 94)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se evapora la muestra en una cápsula de evaporación previamente pesada. La cápsula con el residuo se coloca en estufa durante el tiempo necesario hasta lograr peso constante a 103 -105 °C. Se coloca la cápsula en un desecador, se deja hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesa. El aumento de peso de la cápsula representa los sólidos totales de la muestra. Luego se calina la muestra en mufla a 550 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante. Se coloca nuevamente en desecador y al alcanzar la temperatura ambiente, se pesa y se calculan los sólidos totales fijos y los sólidos totales volátiles.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica y guantes de latex descartables.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Se eliminan de la muestra las partículas gruesas flotantes o los aglomerados sumergidos de materiales no homogéneos si se decide que su inclusión no es deseable en el resultado final.
- 5.2. En caso de residuo excesivo, se debe disminuir el volumen de la muestra para que proporcione un residuo no mayor de 200 mg dado que la misma puede formar una capa conteniendo agua, no permitiendo su liberación.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Se recogen las muestras en frascos de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro.
- 6.2. El volumen típico de la muestra es de 500 mL.
- 6.3. Se conserva la muestra refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante un período de siete días como máximo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Baño de agua con soporte para cápsulas
- 7.2. Estufa para operar a 103 - 105 °C
- 7.3. Mufla para operar a 550 °C
- 7.4. Desecador provisto de un desecante que contiene un indicador de color para la concentración de humedad (sílica gel).

- 7.5. Balanza de resolución de 0,0001 g
- 7.6. Cápsula de porcelana de más de 100 mL de capacidad
- 7.7. Probeta de 100 mL
- 7.8. Pinzas metálicas para manejo de cápsulas.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.2. Solución de Control de Sólidos: Preparada a partir de 0,300 g de ftalato ácido de potasio ($C_8H_5KO_4$ Nro. CAS 877-24-7) y 0,500 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5). Ver preparación en el manual de Calidad Analítico- Laboratorio Ambiental de DINAMA.
- 8.3. Sílica gel con indicador de color.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Es importante secar los residuos a la temperatura definida, debido a que ésta puede influir considerablemente en el resultado.
- 9.2. Antes de transferir la muestra a la cápsula de evaporación, se debe homogeneizar por inversión repetidas veces.
- 9.3. Se debe pesar la cápsula de evaporación inmediatamente después de sacarla del desecador para evitar un cambio de peso al exponer la cápsula con los sólidos al ambiente.
- 9.4. Se recomienda iniciar el análisis lo antes posible (dentro de las 24 h) para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación de las cápsulas

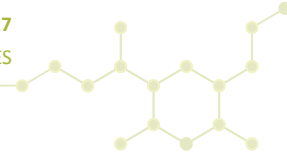
- 11.1. Secar la cápsula de porcelana limpia en la estufa durante una hora a 103 - 105 °C. Si se van a medir sólidos fijos y volátiles se debe colocar la cápsula en una mufla durante una hora a 550 °C.

Análisis de la muestra

- 11.2. Colocar la cápsula en un desecador hasta equilibrar la temperatura ambiente y pesar (P1).
- 11.3. Agitar la muestra por inversión para homogeneizar; tomar un volumen adecuado de la muestra, de forma tal de que sea conveniente para generar un residuo seco mínimo de 2,5 mg y máximo de 200 mg.
La toma puede ser realizada con probeta graduada (50,0 mL de volumen como mínimo) y transferirlo a la cápsula, previamente tratada según punto 11.1 y pesada. Para efluentes industriales generalmente se toman 100 mL y para aguas naturales al menos 200 mL.
Puede considerarse la toma con pipeta de forma tal que la muestra que se extrae sea representativa de la muestra total.
Si se observa que la muestra se adhiere a las paredes del frasco, se recomienda sea informado.
- 11.4. Evaporar la muestra en un baño de agua hasta sequedad y luego secar la cápsula con el residuo de la muestra en la estufa durante el tiempo necesario para lograr peso constante a 103 - 105 °C.
- 11.5. Colocar la cápsula en un desecador hasta que lograr la temperatura ambiente y pesar (P2).

Nota 2: Cada laboratorio debe determinar el tiempo necesario de secado para obtener peso constante, o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % del peso anterior o una diferencia de hasta 0,5 mg.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante de secado en estufa para sus condiciones y equipos en 2 horas, tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.



11.6. Incinerar la muestra en la mufla a 550 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante.

11.7. Colocar la cápsula en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y pesar (P3).

Nota 3: Cada laboratorio debe determinar el tiempo necesario de incineración para obtener peso constante, o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % del peso anterior o una diferencia de hasta 0,5 mg.

El Laboratorio Ambiental de DINAMA realizó la validación, lográndose peso constante de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 2 horas, tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Se calcula la concentración de los sólidos totales en la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Sólidos Totales, mg/L} = (P2 - P1) \times 1000000 / V$$

$$\text{Sólidos Totales Fijos, mg/L} = (P3 - P1) \times 1000000 / V$$

$$\text{Sólidos Totales Volátiles, mg/L} = (P2 - P3) \times 1000000 / V$$

donde:

P1: corresponde al peso de la cápsula vacía en gramos (g).

P2: corresponde al peso de la cápsula más el residuo luego de secado en la estufa en gramos (g).

P3: corresponde al peso de la cápsula más el residuo luego de incinerado en mufla en gramos (g).

V: corresponde al volumen de la muestra en mililitros (mL).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Se analizan por duplicado 50 mL de la solución de Control de Sólidos simultáneamente con cada serie de muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación según el gráfico de control. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de una de cada tres muestras, mínimo una por serie de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

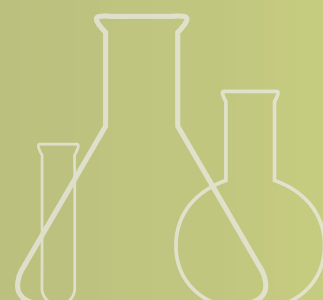
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 22nd. edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2540 – B Total solids dried at 103 °C -105 °C y 2540 – E Fixed and volatile solids ignited at 550 °C pp. 2-64 y 2-67.



1022UY

Determinación de la turbidez en aguas.



Método nefelométrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de la turbidez en muestras líquidas. Este método es adecuado para muestras de agua naturales o agua proveniente de plantas de tratamiento que se asemejen a aguas naturales. Se puede determinar la turbidez entre 0,11 NTU y 4000 NTU. El límite de detección es de 0,036 NTU.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de turbidímetro (INE 92)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza de plato abierto (INE 16)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 18)
- 2.8. Ficha de registro de equipo (FRE 400)
- 2.9. Registro de mantenimiento de equipos (RME 59)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La turbidez en el agua es causada por material en suspensión o coloidal provenientes de arcillas, materiales orgánicos e inorgánicos finamente divididos, plancton y otros organismos microscópicos.
- 3.2. La turbidez es una expresión de la propiedad óptica que causa disminución en la transmisión de la luz a través de la muestra. Se mide en unidades de turbidez nefelométrica (NTU).
- 3.3. Este método está basado en la comparación de la intensidad de la luz dispersada por la muestra, en condiciones definidas, con la luz dispersada por una suspensión estándar de referencia bajo las mismas condiciones. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor será la turbidez.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica y guantes de látex descartables.
- 4.2. Lentes de seguridad y máscara para material particulado (como 3M Particulate respirator 8247 R95 o similar) para la preparación de las soluciones.

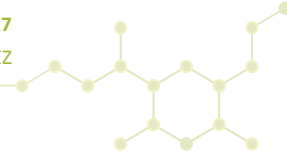
Nota 1: Los reactivos de las soluciones I y II se deben manipular con mucho cuidado, por ser cancerígenos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. **Interferencia negativa:** cuando hay una concentración significativa de material que absorbe la luz tal como carbón activado. Así como también la presencia de sustancias disueltas que generan color, causan una interferencia negativa por absorción de luz.
- 5.2. **Interferencia positiva:** cuando la concentración del mismo material mencionado en el punto anterior se encuentran en bajas concentraciones presenta una interferencia positiva, ya que contribuyen a la turbidez.
- 5.3. Las burbujas y partículas de fácil sedimentación también generan interferencia.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en recipiente de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), un mínimo de 100 mL.
- 6.2. Determinar la turbidez inmediatamente después de extraída la muestra, sin alterar las condiciones originales de temperatura y pH de la muestra.
- 6.3. De lo contrario, refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) para minimizar la descomposición biológica de los sólidos; almacenar hasta 24 h en la oscuridad.



7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. La sensibilidad del equipo debe permitir diferenciar turbidez de 0,02 NTU o menor, en el rango menor de la escala para aguas con turbidez menor a 1 NTU.
- 7.2. **Turbidímetro criterios de diseño:**
 - a. Fuente de luz: lámpara con filamento de tungsteno que opere a una temperatura de entre 2200 y 3000 °K.
 - b. La distancia atravesada por la luz incidente y la luz dispersada en el tubo de muestra no debe exceder los 10 cm.
 - c. El ángulo de la luz aceptado por el detector: centrado en $90 + 30^\circ$ para la luz incidente, si se utiliza un filtro se necesita un pico espectral entre los 400 y 600 nm.
- 7.3. Celdas adecuadas para el turbidímetro, de vidrio o plástico.
- 7.4. Matraces aforados de 100 mL.
- 7.5. Pipetas aforadas de 5 y 10 mL.
- 7.6. Balanza de resolución de 0,01 g
- 7.7. Balanza de resolución de 0,0001 g
- 7.8. Baño de ultrasonido.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Suspensión estándar de formazida:

Solución I:

Disolver 1,000 g de sulfato de hidrazina, $(\text{NH}_2)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ Nro. CAS. 10034-93-2, en agua desionizada y diluir a 100 mL en matraz aforado (el sulfato de hidrazina es cancerígeno, evitar la ingestión, inhalación y el contacto con la piel).

Solución II:

Disolver 10,00 g de hexametileno- tetraamina, $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ Nro. CAS. 100-97-0, en agua desionizada y diluir a 100 mL en matraz aforado.

8.3. Suspensión stock de 4000 NTU:

En un matraz mezclar 5,00 mL de solución I con 5,00 mL de solución II. Dejar reposar 24 h a $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, la suspensión resultante es de 4000 NTU.

Transferir esta suspensión a un frasco ámbar o similar con bloqueo de luz UV, para su almacenamiento. La suspensión stock es estable por un año.

8.4. Preparar diluciones de la anterior suspensión de acuerdo a los rangos de trabajo, utilizando agua desionizada (8.1). Descartar luego de ser utilizadas.

Estas soluciones se utilizan para la realización de curva de calibración y/o de solución control. En forma alternativa se puede emplear las soluciones estándar o de control que acompañan al equipo, de acuerdo a las instrucciones del manual del mismo, en tanto se verifique la validez de las mismas en cuanto a valor declarado.

8.5. También se puede utilizar material de referencia certificado, evitando la preparación de la suspensión stock y sus diluciones.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Homogenizar la muestra agitando varias veces y medir la turbidez rápidamente para prevenir cambios de temperatura, floculación y sedimentación de partículas.
- 9.2. Es necesario eliminar todas las burbujas que contenga la muestra antes de su medición.
- 9.3. En caso de almacenamiento y refrigeración de la muestra, dejar alcanzar temperatura ambiente antes de realizar el análisis
- 9.4. Evitar siempre que sea posible la realización de diluciones, dado que se puede producir la dilución de partículas en suspensión lo que puede redundar en el cambio en otras características de la muestra.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Según el instructivo del equipo INE 92

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Medir la turbidez lo más pronto posible después de tomada la muestra, para evitar cambios de temperatura de la muestra y la floculación o sedimentación de partículas que cambien las características de la misma. De lo contrario tomar en cuenta lo establecido en el apartado 6. Si se detecta la floculación de la muestra, romper los agregados con agitación.
- 11.2. Agitar la muestra por inversión varias veces inmediatamente antes de realizar el análisis, colocar en la celda de medición desgasificar y leer la turbidez directamente del display del equipo.
- 11.3. Se logra la desgasificación de la muestra al colocar la celda de medición por 1 - 2 segundos en un baño de ultrasonido, eliminado toda burbuja y aire que contenga (verificar que las celdas usadas sean aptas para baño de ultrasonido).
- 11.4. La muestra debe estar a temperatura ambiente, para evitar que la celda se empañe por condensación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Los resultados se expresan en NTU (Unidades de Turbidez Nefelométrica). Si es necesario realizar dilución de la muestra para realizar la lectura, multiplicar la turbidez por el factor de dilución de la muestra.

$$\text{Turbidez (NTU)} = \text{Turbidez leída} \times \text{FD}$$

donde:

FD: Volumen final / Toma de muestra

12.2. Expresar los resultados de turbidez considerando los límites especificados por el equipo utilizado para la determinación y según la siguiente tabla. De acuerdo al rango de lectura de turbidez redondear al próximo número utilizando la unidad mínima indicada:

| Rango de lectura de turbidez (NTU) | Unidad mínima (NTU) | Rango de lectura de turbidez (NTU) | Unidad mínima (NTU) |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|
| 0 – 1,0 | 0,05 | 100 – 400 | 10 |
| 1 – 10 | 0,1 | 400 – 1000 | 50 |
| 10 – 40 | 1 | > 1000 | 100 |
| 40 – 100 | 5 | | |

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

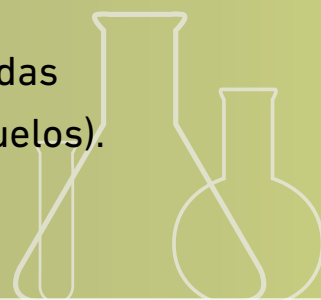
- 13.1. **Control de la precisión:** Se realiza un duplicado cada tres muestras, y como mínimo un duplicado por serie de medidas. Se aceptara si el valor del rango normalizado obtenido de la medición del duplicado esta dentro de los limites establecidos por el grafico de control correspondiente. En caso de desvío, consultar el Manual de Control de Calidad Analítico y evaluar la repetición del análisis.
- 13.2. **Control de exactitud:** Si fuera posible, utilizar un material de referencia certificado de concentración menor a 50 NTU; aceptando una diferencia máxima con el valor del certificado de un 10 %. En caso de no disponer del mismo, preparar una solución independiente tal como se describe en 8.2, 8.3 y 8.4.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd. edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 2130 B Turbidity Nephelometric Method pp. 2-13 al 2-15.

1050UY

Determinación de humedad en muestras sólidas
(residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos).



Método termogravimétrico

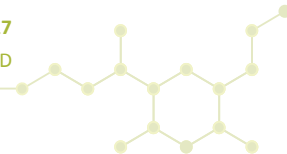
Elaborado - M. Capandeguy

Modificado - No aplica

Revisado - G. Pistone, Jefe Sector Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de contenido de humedad en suelos, sedimentos y residuos sólidos.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso equipos balanza de humedad FQ 553 (INE 113)
- 2.6. Ruta de análisis (RFQ 36)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El término contenido de humedad hace referencia a la relación entre el agua contenida en los espacios porosos del material y la masa sólida de partículas, expresada como porcentaje.

El principio utilizado en este método para medir la cantidad de agua de una muestra, es un método termogravimétrico, ya que determina el contenido de agua basándose en la diferencia de masa de la materia antes y después de someterla a un proceso de secado a $105\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

Este método fue elaborado de tal manera que el contenido de humedad pueda ser determinado utilizando tanto una balanza de humedad de luz halógena como utilizando una estufa de secado y una balanza de resolución adecuada.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Utilizar lentes, guantes y túnica para el manejo de las muestras.
- 4.2. En muestras complejas, se deberá trabajar con la campana de extracción prendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Durante el almacenamiento las muestras pueden sufrir alteraciones (absorción o liberación de agua, de dióxido de carbono y de diversas sustancias). También puede interferir en la determinación de la humedad la presencia de sustancias volátiles.
- 5.2. La absorción de la radiación infrarroja depende del color de la superficie por lo tanto, una muestra con distribución irregular de color puede provocar un calentamiento diferencial de la muestra, interfiriendo así en la temperatura de secado. Esto se puede solucionar cubriendo la muestra con un filtro de fibra de vidrio. También es recomendable cubrir la muestra con un filtro de fibra de vidrio cuando la muestra es oleosa, ya que se puede formar una costra que no permita evaporar el agua.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar aproximadamente 100 g de muestra en bolsa de plástico y cerrar sin dejar cámara de aire. La muestra se refrigera a temperatura $\leq 6\text{ °C}$ ($> 0\text{ °C}$) en heladera hasta el momento de su análisis (por un tiempo máximo de 7 días).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Balanza de humedad (INE 113) (Ej: Shimadzu MOC63u)
- 7.2. Platillo descartable de aluminio para balanza de humedad
- 7.3. Espátula
- 7.4. Filtro de fibra de vidrio (Ej: Catalogo Mettler Toledo #214464)
- 7.5. Opcional: estufa de secado a 105 °C y balanza de resolución 0,001 g

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

En muestras complejas, el analista podrá variar la temperatura de secado para evitar/minimizar reacciones químicas peligrosas, dejando registro en el informe de resultado, la temperatura utilizada.

Utilizando balanza de humedad:

11.1. Tarar la balanza de humedad con el platillo descartable de aluminio.

11.2. Seleccionar una parte de la muestra para el ensayo. Para ello, tomar al menos cinco porciones del material de puntos al azar que puedan representar mejor las condiciones de humedad, combinar todas las porciones para formar la muestra.

11.3. Se recomienda usar entre 10-15 g de muestra excepto para muestras con bajo contenido de humedad, para las cuales se recomienda usar 20-30 g. Considerar también que la cantidad de muestra debe de ser la suficiente para cubrir uniformemente toda la superficie del platillo. Usar siempre la misma cantidad ayuda a conseguir un alto grado de repetitividad.

11.4. El método a utilizar (de los disponibles en el programa de la balanza de humedad), depende de la muestra. Ver *INE 113 (Instructivo de uso de la balanza de humedad)*.

Muestras muy húmedas (sedimentos) y muestras pastosas (residuos sólidos): se selecciona el método de secado automático [AUTO]. Se configura la temperatura a 105 °C y la variación de masa a 0,5 %: de esta manera, el programa finaliza cuando la variación de masa en porcentaje masa/masa por 30 segundos es igual o menor a 0,5.

Muestras oleosas, formadoras de películas o costras: se selecciona el método de secado lento [SLOW] en el cual la temperatura aumenta más gradual- y lentamente. Se configura la temperatura a 105 °C y la variación de masa a 0,5 %. Para este tipo de muestras se recomienda cubrir la muestra con un filtro de fibra de vidrio. Para eso es necesario tarar el platillo junto con el filtro. Se coloca la muestra en el platillo y se cubre con el filtro.

Muestras con alto contenido de materia orgánica: se selecciona el método de secado lento [SLOW]. Se configura la temperatura a 50 °C y la variación de masa a 0,5 %. En este caso, se debe dejar registrado que la temperatura de secado no fue la estándar.

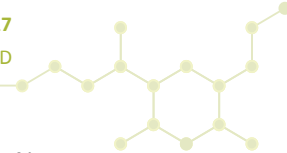
Otras muestras: se selecciona el método de secado automático [AUTO]. Se configura la temperatura a 105 °C y la variación de masa a 0,5 %.

Utilizando estufa de secado y balanza de resolución 1 mg:

11.5. Cuando no se cuenta con una balanza de humedad o cuando la cantidad de muestras a analizar es muy grande, se utiliza una estufa de secado. Para eso se deben seguir los pasos dos y tres de este procedimiento (Análisis de muestra 9.2 y 9.3) y se registra el peso inicial de la muestra (W). Se coloca la muestra en estufa de secado a 105 °C (o 50 °C en el caso de muestras con alto contenido de materia orgánica) hasta peso constante; este se define como la diferencia de peso menor a 0,5 % (m/m) para dos pesadas consecutivas con una hora de diferencia. Este peso constante se registra como peso final (D).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El contenido de humedad se informa en base húmeda. La balanza de humedad permite reportar el contenido de humedad de diversas formas, debe de estar configurada para reportarlo de esta manera. Ver *INE 113 (Instructivo de uso)* para cambiar las unidades en que se reporta.



Cuando se trabaja con estufa de secado, el contenido de humedad se calcula manualmente según la fórmula descrita a continuación. La balanza de humedad también permite desplegar el peso inicial y el final para calcular manualmente el contenido de humedad.

Contenido de humedad en base húmeda (M/W) en porcentaje = $(W-D)/W \times 100$

donde:

W: corresponde a masa húmeda, inicial

D: corresponde a masa seca, final

M: es la diferencia entre la masa húmeda menos la masa seca

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ISO 11465:1993, Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method. 1993. International Organization for Standardization.

14.2. ISO 5667-15:2009, Sampling – Part 15: Guidance on the preservation and handling of sludge and sediment samples. 2009. International Organization for Standardization.



1073UY

Determinación de material particulado en aire por filtración forzada en equipos ubicados en el punto de muestreo de interés.



Método gravimétrico a partir de muestreadores de alto volumen

Elaborado - F. Lauber

Modificado - V. Muñoz

Revisado - P. Simone

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de material particulado en aire por filtración forzada en equipos ubicados en el punto de muestreo de interés. El límite de cuantificación de la determinación de material particulado del aire (PTS) es de $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y el de detección es de $0,51 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Para la determinación del material particulado menor a $10 \mu\text{m}$ de diámetro del aire (PM10), el límite de cuantificación es de $4,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y el de detección, de $0,87 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Tablas de relación Temperatura – (P_o/P_a) correspondiente al equipo empleado (Flow Look-Up Table High volume sampler).
- 2.6. Instructivo de pesada de filtros (INE 56).
- 2.7. Instructivo para calibración de la balanza (INE 55).
- 2.8. Ruta de análisis para la determinación de material particulado en aire (RFQ 19).
- 2.9. Ruta de análisis para material de aire (RAD 04).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

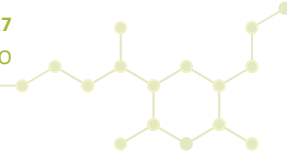
- 3.1. El aire a muestrear es conducido por los muestreadores de alto volumen a través de un filtro de fibra de vidrio o de fibra de cuarzo de manera que el material particulado suspendido sea colectado en la superficie del filtro con un mínimo de eficiencia de colección de 99 % para partículas de $0,3 \mu\text{m}$ de diámetro.
- 3.2. La geometría de la tapa protectora del colector y la velocidad del flujo de aire favorece la colección de partículas menores de $100 \mu\text{m}$ de diámetro (PTS) y con el dispositivo selector de tamaño se colectan preferentemente partículas menores a $10 \mu\text{m}$ de diámetro (PM10).
- 3.3. Los filtros son pesados antes y después de la exposición para la determinación de la ganancia en peso. El volumen de aire muestreado se determina con la velocidad de flujo y el tiempo de muestreo. La concentración de partículas en el aire es calculada como la masa de material colectado en el filtro sobre el volumen de aire muestreado.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Tomar el menor contacto posible con el filtro a los efectos de evitar contaminación en el mismo.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. En el muestreo:
 - a. Grandes objetos, tales como insectos, que puedan ser depositados sobre el filtro.
 - b. Aerosoles líquidos, tales como niebla de aceites o gotas de neblina son retenidos en el filtro. Si la cantidad de líquido colectado es apreciable, el filtro puede quedar húmedo y este valor no ser representativo.
 - c. Algunos gases o vapores constituyentes de la atmósfera muestreada que reaccionan o son absorbidos sobre el filtro podrían ser retenidos.
 - d. El dióxido de azufre (SO_2) y los óxidos de nitrógeno (NOX) atmosférico pueden interferir por la formación de artefactos debidos a la retención de SO_2 en forma de sulfato (SO_4^{-2}) en filtros alcalinos. Para el uso de filtros de fibra de vidrio en condiciones normales un error de $0,3\text{-}3,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ puede ser esperado, en condiciones extremas el error puede ser mayor.
 - e. Cuando el filtro se carga con el material colectado, la velocidad de muestreo puede ser reducida. Si ocurre una caída significativa en la velocidad del flujo de aire, el promedio del flujo inicial y final no dará una estimación exacta de este, durante el período de muestreo. La magnitud de tales errores dependerá del porcentaje de reducción de la velocidad del flujo de aire y de la variación de concentración de masa de polvo dentro del las 24 horas que involucra el período de muestreo. Una guía aproximada, cualquier



muestra debería ser sospechosa de error si la velocidad de flujo final es menos que $\frac{1}{2}$ de la velocidad inicial. Esto se verifica a través de los datos de presión inicial y final leídas en el manómetro que posee el equipo. La mayor exactitud en la medida de la velocidad de flujo de aire se alcanza cuando se utilizan equipos con mecanismos de control que mantienen constante el flujo de aire durante el período de muestreo. Otro procedimiento posible para evitar el error introducido por las variaciones de la velocidad del flujo de aire, en equipos sin dispositivos de control, es usar un dispositivo que registre la velocidad del flujo durante todo el período de muestreo e integrar los valores en función del tiempo, o realizar una medida exacta del volumen total de aire muestreado.

- f. Fallas de poder o cambios de voltaje durante el período de muestreo llevarían a un error, dependiendo de la extensión y tiempo de duración de tal falla.
- g. El depósito pasivo sobre el filtro dejado en el equipo antes o después del período de muestreo puede introducir errores. El tiempo de instalación y remoción del filtro debe ser prudente o deben utilizarse muestreadores con obturadores.
- h. Si dos o más muestreadores son utilizados en un mismo lugar, deberían estar ubicados al menos a dos metros de distancia uno del otro, de manera de no alterar resultados de muestreadores adyacentes.
- i. En atmósferas conteniendo altas concentraciones de partículas de gran tamaño pueden existir errores significativos en función de la orientación del viento respecto al muestreador.
- j. Polvo metálico de motores, especialmente cobre, pueden ser contaminantes bajo algunas condiciones.
- k. Pérdida de partículas post muestreo.
- l. Errores en el timer. Debido a interrupciones en la fuente de poder durante el muestreo, o a discrepancias entre los tiempos de inicio y fin registrados y los valores reales, tales diferencias pueden ser causadas por pobre resolución del timer, error del mismo por fallas en la fuente de energía o mal funcionamiento
- m. Recirculación de aire ya muestreado. Bajo condiciones de viento estancado, los muestreadores pueden remuestrear el aire. Este efecto es poco significativo para la determinación de PTS pero incrementa los resultados de determinación de cobre y carbón.

5.2. En el análisis:

- a. Si las partículas colectadas en el filtro son higroscópicas, el control de humedad que realiza el dispositivo de secado puede ser insuficiente, resultando en más el valor del peso final.
- b. Pérdida de volátiles. Las partículas volátiles colectadas en el filtro podrían perderse durante el propio muestreo, o en los procedimientos y/o almacenaje de los filtros antes de la pesada post muestreo. Para minimizar la pérdida post muestreo el filtro es doblado a la mitad, con el material colectado hacia adentro, y luego colocado en el sobre de nylon original.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Colocar tanto el filtro en el equipo, como el disco para registro del equipo: DICKSON Gráficos de 10,2 cm de diámetro o similar y programar el equipo para que funcione durante 24 horas. Medir la presión en el manómetro del equipo al comienzo y al final de la operación. Completar la Planilla de Registro del filtro correspondiente. La muestra típica es un filtro por punto de muestreo.
- 6.2. Doblar el filtro con el material particulado hacia adentro, colocando el papel dentro del sobre de nylon correspondiente. Mantener a temperatura ambiente.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Balanza de resolución 0,0001 g (Sartorius LA 130 SF o similar)
- 7.2. Filtros para determinación de Material Particulado (PTS): filtros de microfibras de cuarzo, WHATMAN tamaño 20,3 cm x 25,4 cm catálogo número 1851 865 o similar.
- 7.3. Filtros para la determinación de Material particulado menor a 10 micras: GRASEBY GMW P/N – G810, tamaño 20,3 cm x 25,4 cm o similar.
- 7.4. Filtros para la determinación de PTS o PM 10: microfibras de vidrio de alta pureza, EPM 2000, tamaño 8 in x 10 in o similar.
- 7.5. Dispositivo para alojar filtros bajo humedad controlada.
- 7.6. Sobres de nylon para alojar los filtros.
- 7.7. Etiquetas para identificar los sobres de nylon.

- 7.8. Sobres de papel tamaño apto para guardar las series de filtros que se envían para muestreo.
7.9. Higrómetro de resolución al 1 %.

8. REACTIVOS

- 8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Tener cuidado de no romper el filtro antes o después del muestreo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. El equipo de muestreo es calibrado por el solicitante.
10.2. La balanza donde se realizan las pesadas debe ser calibrada cada vez que se enciende según instructivo.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación de los filtros previa al muestreo.

- 11.1. Colocar los filtros nuevos sin doblar, en el dispositivo de secado, cada uno en un estante diferente durante un día (humedad controlada entre 40 y 45 %).
11.2. Pesar los filtros, en la balanza previamente calibrada, según instructivos.
11.3. Registrar en la planilla correspondiente (RFQ 19) número y peso inicial del filtro.
11.4. Colocar el filtro en un sobre de nylon. Etiquetar el sobre indicando número y tipo de filtro, y peso inicial.
11.5. Preparar grupos de 10 filtros y guardarlos en un sobre de papel adecuado rotulado indicando: tipo de filtro, números de los filtros, y número de sobre.
Agregar además 10 discos de control de equipo.
11.6. Registrar el número de filtro en el formato RAD 04 Ruta de análisis para material de aire, donde se asigna el número de sobre.

Tratamiento de filtros usados

- 11.7. Registrar el ingreso de la muestra recibida, y asignarle un número de análisis. El filtro debe llegar al laboratorio doblado a la mitad con el material colectado hacia adentro y dentro de su sobre de nylon original, acompañado con los datos de campo y el formato para Registro de Ingreso de Muestras de Filtros de Aire (RIG 12). En los sitios que cuentan con equipos para el muestreo de PTS y PM10 los equipos de PTS no cuentan con contador, se utilizan entonces los valores del equipo de PM10.
11.8. Colocar el filtro usado doblado como llegó al laboratorio en el dispositivo de secado, mínimo 24 horas, con el fin de estandarizar su humedad (humedad controlada 40 –45 %).
11.9. Pesar el filtro doblado según instructivo de pesada de filtros y devolverlo al sobre original.
11.10. Registrar el peso final en la planilla correspondiente (RFQ 19).

Nota 1: No poner filtros nuevos y usados juntos en el desecador para evitar contaminación cruzada.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. El material particulado se calcula según la siguiente ecuación:

$$C (\mu\text{g}/\text{m}^3) = \frac{\Delta M \times 10^6}{Q_{\text{STD}} \times \Delta t \times 60}$$

donde:

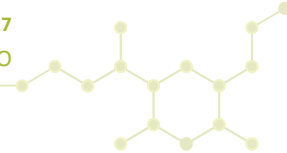
ΔM : corresponde a la diferencia de masa entre la pesada inicial y final (gramos)

Δt : corresponde al tiempo de exposición del filtro (horas)

10^6 : corresponde al factor de conversión de gramos a microgramos

60: corresponde al factor de conversión de horas a minutos

Q_{STD} : corresponde al caudal en condiciones estándar



Q_{STD} se calcula de la siguiente forma:

$$Q_{STD}(\text{m}^3/\text{min}) = \frac{Q_a \times P_a \times 298}{760 \times (T_a + 273)}$$

donde:

Q_a : es el caudal calculado a partir de la relación de presiones P_o/P_a y la temperatura en ese día (T_a en °C).

Para cada equipo existe una tabla con las correspondientes relaciones y caudales.

P_o/P_a está dada por la ecuación:

$$P_o/P_a = 1 - ((P_M / 0,5353)/P_a)$$

donde:

P_M : corresponde a la presión promedio medida, en el manómetro, al comienzo y final del muestro y está dada en pulgadas de H_2O .

P_a : corresponde a la presión atmosférica de ese día en mmHg, siendo 0,5353 el factor de conversión de pulgadas de H_2O a mmHg.

P_a : corresponde a la conversión de Hectopascuales a mmHg $= (P_{(HP)} / 1013,25 \times 760) = P_{(mmHg)}$

12.2. Las condiciones que deben cumplirse para el cálculo de PTS y PM10 son las siguientes:

- El tiempo de exposición debe estar dentro del rango $24,0 \pm 3,6$ h.
- La diferencia de peso en los filtros debe ser mayor que el LD calculado para cada tipo de filtro: 0,0005 g para PTS y 0,0009 g para PM10.
- La relación P_o/P_a debe ser menor que 0,979 de acuerdo a las tablas proporcionadas por los equipos, en caso de caer fuera de tabla, estimar con el punto máximo de la tabla, informando un valor estimado.
- Q_{std} debe estar entre 1,1 -1,7 m^3/min para PTS y entre 1,017-1,243 m^3/min para PM10.
- Límite de cuantificación :

PTS: 2,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

PM10: 4,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Se informa con 2 cifras significativas.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Debido a las características del muestreo es imposible realizar análisis de exactitud y precisión.

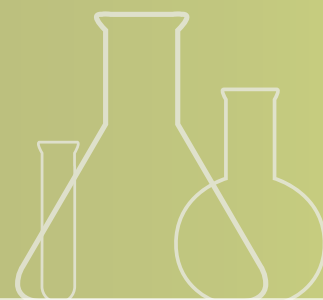
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. EPA - Compendium Method IO 2.1 – Sampling of ambient air for Total Suspended Particulate Matter (SPM) and PM10 using High Volume (HV) Sampler.
- 14.2. EPA - Reference Method for the Determination of Suspended Particulate Matter in the Atmosphere (High – Volume Method), Title 40, chapter I, part 50 appendix B, pp 25-35.
- 14.3. Ambient Air Quality Surveillance, Title 40, chapter I, part 58.



1074UY

Determinación del Índice de Corrosividad
en aire a partir de discos de acero.



Método gravimétrico

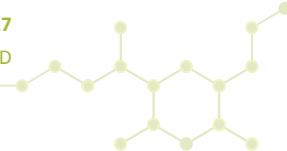
Elaborado - V. Muñoz

Modificado - V. Muñoz

Revisado - P. Simone

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación del Índice de Corrosividad en aire a partir de discos de acero.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis para la determinación de índice de Corrosividad en aire (RFQ 24)
- 2.6. Instructivo para calibración de la balanza PRECISA 205A (INE 15)
- 2.7. Instructivo para el uso del calibre OMNIA ROLL (INE 54)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se exponen al aire libre, durante un mes en una caseta muestreadora, dos discos normalizados de acero, previamente pesados. Al final de este período se determina el peso final, calculando así el aumento de peso de cada disco, que corresponde al oxígeno y otras sustancias combinadas para formar óxidos y sales de hierro.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Muestreo:

- 6.1. Se colocan dos discos previamente pesados e identificados en los marcos del soporte, de la caseta de muestreo, registrando fecha, punto de muestreo, número y ubicación cardinal de la caseta.
- 6.2. Se dejan al aire libre durante un mes, con la precaución de que no existan interferencias dentro de un radio de 3 m.
- 6.3. Se retiran los discos y se coloca cada uno en papel aluminio cuidando de no perder masa. Se registra la fecha.
- 6.4. Se colocan en el soporte otros dos discos.

Preservación:

- 6.5. Los discos se preservan envueltos en papel aluminio, a temperatura ambiente, evitando el contacto con el aire, tanto en forma previa a la colocación en el equipo, como una vez quitados de éste.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Desecador
- 7.2. Balanza resolución 0,0001 g
- 7.3. Estufa para secado a 103 –105 °C
- 7.4. Pinzas
- 7.5. Discos de acero SAE 1010 de 7,0 cm de diámetro y 2 mm de espesor
- 7.6. Calibre con precisión a la décima de milímetro, OMNIA ROLL o similar
- 7.7. Papel aluminio
- 7.8. Parafilm (sólo para discos preparados y no para discos ya expuestos)
- 7.9. Etiquetas para identificar los discos envueltos
- 7.10. Esponja de aluminio para limpieza
- 7.11. Cepillo

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente) para preparar solución de ácido y limpieza de materiales.
- 8.2. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664 -93-9) concentrado para preparar solución de H_2SO_4 al 10 %.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Para la limpieza previa del disco se utiliza ácido sulfúrico 10 % si el disco está muy sucio o ya ha sido usado, se enjuaga con agua destilada. Al terminar con esto o si el disco esta apenas sucio se pasa la esponja de aluminio debajo de un chorro de agua y se termina enjuagando con agua destilada.

Colocar el disco en la estufa a 103 – 105 °C durante 20 min. Pasarlo a un desecador. Una vez a temperatura ambiente pesarlo en la balanza previamente calibrada. Registrar el número y el peso del disco en la planilla correspondiente (RFQ 21). Envolver el disco con papel aluminio, colocarle una etiqueta para su identificación. Realizar esta operación rápidamente.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Registrar el ingreso de la muestra recibida y asignarle un número de análisis, que se anota en la planilla de ruta de análisis correspondiente (RFQ 21).
- 11.2. Se coloca el disco durante dos horas en la estufa a 103 – 105 °C con el papel aluminio abierto, después se pasa el disco junto con el papel en un desecador.
- 11.3. Una vez a temperatura ambiente se pesa el conjunto y se registra. Luego se pesa el papel aluminio limpio (previo cepillado) y se registra el dato.
- 11.4. Calcular el peso final por diferencia de peso entre el conjunto disco - papel menos el peso del papel de aluminio.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Se calcula el aumento de peso del disco restando los pesos final e inicial.
- 12.2. El índice de corrosividad se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de corrosividad} \quad = \quad \frac{19 \times \text{aumento de peso}}{D \times (D + 2 \times H) \text{ tiempo de exposición}}$$

(mg/cm²/30 días)

donde:

D: diámetro del disco.

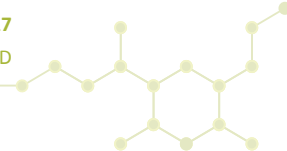
H: altura del disco.

El detalle del cálculo anterior es:

$$\text{Superficie del disco} = \frac{2 \times \pi \times D^2}{4} + (\pi \times D \times H)$$

$$\text{Superficie del disco} = \frac{\pi \times D}{2} (D + 2 \times H)$$

$$\text{Índice de corrosividad} \quad = \quad \frac{\text{Aumento de peso}}{\text{(por día)} \quad \frac{\pi \times D}{2} (D + 2 \times H) \times \text{tiempo de exposición}}$$



$$\text{Índice de corrosividad (por 30 días)} = \frac{\text{Aumento de peso} \times 30}{\frac{\pi \times D \times (D + 2 H)}{2} \times \text{tiempo de exposición}}$$

$$\text{Índice de corrosividad ponderado (mg/cm}^2\text{/ 30 días)} = \frac{[(IC \ 1 \times \text{días (IC 1)}) + (IC2) \times \text{días (IC2)}]}{30 \text{ días}}$$

$$\text{Promedio índice corrosividad de los dos discos (mg/cm}^2\text{/ 30 días)} = \frac{IC1 + IC2}{2}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Debido a las características del muestreo es imposible realizar análisis de exactitud y precisión.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Red Panamericana de Muestreo Normalizado de la Contaminación del Aire. Manual de Operaciones, OMS; OPS; CEPIS, Segunda Edición, Enero de 1970.



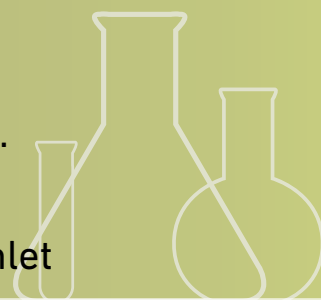
SECCIÓN 2





2001UY

Determinación de aceites y grasas en aguas naturales y en efluentes líquidos industriales.



Método gravimétrico, con extracción por Soxhlet

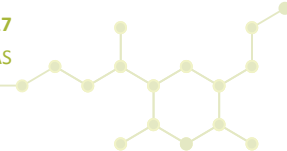
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aceites y grasas en efluentes líquidos industriales y domésticos.

Es posible la determinación de aceites y grasas entre 16 mg y 1000 mg de grasas y aceites por litro. El límite de detección es de 5,4 mg/L.

No es aplicable para medir fracciones de baja ebullición, que se volatilizan por debajo de 85 °C.

En la determinación de aceites y grasas no se mide una cantidad absoluta de una sustancia específica. Los aceites y grasas son definidos de acuerdo al método usado para su determinación.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de la planchas Soxhlet 4 y 6 posiciones (INE 31)
- 2.6. Instructivo de uso de la bomba de vacío (INE 01)
- 2.7. Instructivo de uso del destilador Branstead (INE 36)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 01)
- 2.9. Instructivos de uso de balanza (INE 94)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Aceites y grasas se considera cualquier material recuperado de la muestra acidificada, como una sustancia soluble en hexano y no volatilizable durante el ensayo. Incluye además de aceites y grasas, otros materiales extraíbles por el solvente.
- 3.2. Los aceites y grasas quedan definidos por el método de análisis utilizado.
- 3.3. Los aceites y las grasas viscosas presentes, así como los sólidos, son separados por filtración de la muestra líquida acidificada, mientras que los jabones metálicos son hidrolizados por la acidificación. Los aceites y grasas que quedan retenidos en el filtro, se extraen con hexano en un equipo Soxhlet, durante 4 horas con una frecuencia de reflujo de 20 ciclos por hora. La ganancia de peso en el frasco de extracción luego de evaporado el solvente corresponde al contenido de aceites y grasas presentes en la muestra.
- 3.4. El tiempo y la velocidad de extracción son puntos críticos en la determinación.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El hexano es volátil e inflamable por lo que se debe tener especial cuidado en la manipulación, evitar derrames y trabajar dentro de la campana de extracción.
- 4.2. Debido a la toxicidad inherente del hexano, evitar contacto directo e inhalación por parte del operario, utilizar túnica; lentes de seguridad y máscara con filtro para solventes orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/ organic vapor cartridge o similar).
- 4.3. Evitar pérdidas en las mangueras de agua del refrigerante del equipo Soxhlet, para no dañar las planchas y evitar entrada de agua en los balones.
- 4.4. Asegurar que el equipo posea el aislamiento adecuado para evitar incendios frente a posibles derrames de solvente o agua sobre las planchas calefactoras.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los solventes orgánicos tienen la habilidad de disolver no solamente aceites y grasas sino también toda otra sustancia orgánica. Cualquier sustancia que sea soluble en el solvente y filtrable (ej: sulfuro elemental, compuestos aromáticos, hidrocarburos derivados de cloro, sulfuro y nitrógeno, así como ciertas tintas orgánicas) que son extraídas y recuperadas, son definidas como aceites y grasas. No se conoce un solvente que disuelva selectivamente aceites y grasas.

- 5.2. Todo material de origen orgánico como insectos, hojas puede falsear el resultado. Retirarlos previo a la determinación.
- 5.3. La remoción de solvente resulta en la pérdida de hidrocarburos de cadenas cortas y aromáticos simples por volatilización.
- 5.4. Llevar adelante en forma exacta el tiempo de secado, de lo contrario se corre el riesgo de tener pérdida en el peso debido a volatilización.
- 5.5. Durante la etapa de enfriamiento se debe usar desecador, para evitar incremento en el peso debido a higroscopicidad.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad; Procedimiento 16 (PR 16) "Limpieza de materiales". Brevemente: lavar el frasco de vidrio de boca ancha con jabón, enjuagar con agua de grifo y finalizar con un último enjuague con hexano.
- 6.2. Recolectar aproximadamente 1000 mL de muestra en un frasco de vidrio de boca ancha. Si se estiman concentraciones altas de grasas, muestrear un volumen menor.
- 6.3. Acidificar a $\text{pH} < 2$ con HCl (1 + 1) o H_2SO_4 (1 + 1) en el mismo recipiente en el cual fue extraída la muestra en el momento del muestreo, para evitar degradación si el análisis no puede ser llevado a cabo dentro de las 2 horas de extracción de la muestra.

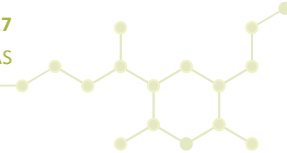
Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de extracción Soxhlet compuesto por balón de extracción de 300 mL de fondo chato, embudo Soxhlet y refrigerante.
- 7.2. Equipo de filtración compuesto por bomba de vacío, embudo Buchner de 11 cm de diámetro, kitasato recolector de filtrado y trampa de agua.
- 7.3. Plancha eléctrica de calentamiento.
- 7.4. Pinza: una de más de 10 cm de largo metálica y otra con punta chata para tomar los cartuchos y el filtro, respectivamente.
- 7.5. Cono de extracción de celulosa tipo Whatman 30 mm x 80 mm (D x h) o similar de acuerdo al tamaño del componente de extracción perteneciente al equipo.
- 7.6. Papel de filtro de 11 cm de diámetro, Whatman Nro. 40 o equivalente.
- 7.7. Piedras porosas, de ebullición y/o cerámicas.
- 7.8. Probeta de 1000 y 500 mL de vidrio o de plástico, vaso de Bohemia de 250 mL de vidrio.
- 7.9. Balanza de resolución 0,0001 g.
- 7.10. Equipo de evaporación de solvente (rotavapor compuesto por baño de agua, ajuste de temperatura variable (entre $60 - 80^\circ\text{C}$), condensador, balón recolector de solvente y trampa de agua para vacío y refrigeración del condensador o equipo similar).
- 7.11. Baño de hielo.
- 7.12. Desecador.
- 7.13. Estufa de secado para ser empleada a 103°C .
- 7.14. Vidrio reloj empleado para sostén de los filtros o similar.
- 7.15. Cápsula de porcelana o material similar donde alojar los cartuchos dentro de la estufa.
- 7.16. Receptáculos para el almacenamiento del hexano ya utilizado.

8. REACTIVOS

- 8.1. n – Hexano, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ Nro. CAS 110-54-3, 85 % mínima pureza, 99 % mínimo saturado en isómeros C6, residuo menor a 1mg/L; destilar si es necesario.
- 8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) (1+1) o Ácido Sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) (1+1).
- 8.3. Tierra diatomeas (tipo Super-Cel, Manville Corp, o equivalente), en suspensión 1 g/100 mL en agua destilada.
- 8.4. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)



Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. La muestra debe estar homogeneizada ya a temperatura ambiente para la realización del análisis.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Numerar y colocar los balones limpios con las piedras de ebullición en un desecador, dejar estabilizar hasta obtener peso constante, pesar con balanza de precisión 0,1 mg (p1). Registrar el peso en la ruta de análisis.

11.2. Marcar el nivel de muestra en el frasco de muestreo.

11.3. Colocar un papel de filtro en el embudo Buchner y humedecerlo con agua destilada. Haciendo vacío pasar 100 mL de suspensión de tierra diatomeas de 10 g/L a través del filtro y lavar con 1 L de agua destilada.

11.4. Agitar la muestra previo a la filtración. Filtrar la misma directamente desde el frasco de muestreo. En caso de que no sea posible filtrar la totalidad de la muestra por saturación del filtro, determinar el volumen remanente trasvasando la muestra que quedó a una probeta registrando así el volumen sin filtrar (v2).

11.5. Realizar la medida de volumen total de muestra colocando agua hasta la marca realizada inicialmente en el envase y midiendo este volumen de agua (v1). El volumen de muestra filtrado surge a partir de la diferencia entre v1 y v2.

11.6. Usando pinzas colocar el filtro ubicado en el Büchner sobre otro filtro seco contenido en un vidrio reloj. Pasar un tercer papel de filtro embebido en hexano por el embudo y por el frasco de muestreo, asegurándose de remover las películas de grasas y material sólido presente. Juntar los filtros en el vidrio reloj, envolverlos y colocarlos en el cono de extracción.

11.7. Secar el cono de extracción en estufa a 103 °C por 30 minutos.

11.8. Colocar el cono en el embudo Soxhlet. Agregar la cantidad necesaria de hexano al balón de extracción de forma tal de poder asegurar las condiciones de reflujo (en el caso de destilador con volumen de 100 mL emplear 180 mL de hexano para cada balón).

11.9. Conectar el equipo de extracción y el agua para la refrigeración. Primero abrir la canilla de agua para que circule por el refrigerante, que se encuentra atrás de las planchas, de color rojo. Colocarla en posición intermedia.

11.10. Verificar que los refrigerantes no tengan pérdidas de agua.

11.11. Encender la plancha. Ajustar la potencia para lograr una velocidad de extracción de 20 ciclos de evaporación-condensación por hora, durante 4 horas, tiempo tomado a partir del primer ciclo.

Nota 2: Verificar a partir del RCE 45 de la Carpeta de Mantenimiento y Control de Equipos (FRE 19), donde se encuentra registrado el número de posición donde ubicar cada plancha a los efectos de cumplir con los requerimientos de los ciclos.

11.12. Una vez completados los ciclos, apagar la plancha, dejando circular agua por el refrigerante hasta que la plancha y las muestras lleguen a temperatura ambiente, evitando así las pérdidas de hexano.

11.13. Evaporar el solvente del balón de extracción en el rotavapor con el baño de agua entre 60 - 80 °C. Cuando se observa que la condensación del solvente finaliza y el balón queda totalmente sin solvente, sacar el balón de extracción del rotavapor. Colocar el balón en baño de hielo (shock térmico) para detectar presencia de solvente; si existe condensación del solvente continuar la evaporación.

11.14. Colocar el balón de extracción en un desecador hasta peso constante, pesar con precisión de 0,1 mg. (p2)

12. ANÁLISIS DE DATOS

$$\text{aceites y grasas mg/L} = \frac{(p2 - p1) \times 1000}{V}$$

donde:

p1: peso del balón de extracción con perlas de ebullición y cerámicas previo a la extracción (mg).

p2: peso del balón de extracción con perlas de ebullición y cerámicas luego de la extracción (mg).

V: volumen de muestra filtrado en mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Se controla en cada serie de muestras el porcentaje de recuperación de una solución control, según lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico; se verifica que el valor obtenido se encuentre dentro de los límites establecidos por el gráfico de control.

13.2. **Control de blancos:** Cada día de análisis se analiza un blanco de muestra; tomando como criterio de aceptación que el valor obtenido sea menor o igual a la mitad del límite de detección de la técnica.

13.3. **Utilización de material de referencia certificado:** Por lo menos una vez al año, en la medida de lo posible, se deberá analizar material de referencia certificado, o la participación en ejercicio interlaboratorio.

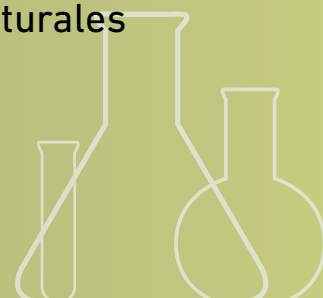
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water Wastewater. 22nd. edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 5520 A Oil and grease Introduction y 5520 D Soxhlet Extraction Method pp. 5-38 a 5-39 y 5-42 a 5-43.

2002UY

Determinación de hidrocarburos en aguas naturales y en efluentes líquidos industriales.

Tratamiento con silica gel de grasas y aceites extraídos con hexano



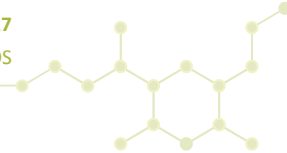
Elaborado - R. Gálvez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta norma técnica se utiliza para determinar hidrocarburos en aguas naturales y en efluentes líquidos industriales.

Es posible la determinación de hidrocarburos entre 16 y 200 mg/L. El límite de detección de esta técnica es de 5,4 mg/L.

Es aplicable también a aguas salinas o salobres. No es aplicable para medir fracciones que se volatilizan por debajo de 85 °C.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de la bomba de vacío (INE 01)
- 2.6. Ruta de análisis (RFQ 01)
- 2.7. Instructivos de balanzas (INE 16B, INE 96)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Este método permite la separación de hidrocarburos de las grasas y aceites extraídos de la muestra con hexano en una etapa anterior (procedimiento 2001UY). Por lo tanto, para realizar este procedimiento siempre se debe haber realizado previamente la determinación de grasas y aceites.
- 3.2. La sílica gel tiene la capacidad de adsorber compuestos polares. Si a una solución de hidrocarburos y de materiales grasos en un solvente apolar se le agrega sílica gel, los ácidos grasos son removidos selectivamente de la solución al quedar adsorbidos por la sílica. Los compuestos que no son adsorbidos por la sílica en este método se denominan hidrocarburos.
- 3.3. Se filtra la solución para remover la sílica y se evapora el solvente (hexano). La cantidad de hidrocarburos se determina por peso y se expresa como mg/L de muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Debido a la toxicidad inherente del hexano evitar contacto directo e inhalación por parte del analista; utilizar mascarilla con filtro para solventes orgánicos y guantes de nitrilo.
- 4.2. El hexano es volátil e inflamable por lo que se debe tener especial cuidado en la manipulación, evitar derrames, y trabajando en campana de extracción.
- 4.3. Asegurar que el equipo posea el aislamiento adecuado para evitar incendios frente a posibles derrames de solvente sobre las planchas eléctricas de calentamiento con agitador.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La remoción de solvente resulta en la pérdida de hidrocarburos de cadenas cortas y aromáticos simples por volatilización.
- 5.2. Llevar adelante en forma exacta el tiempo de secado, de lo contrario se corre el riesgo de tener pérdida en el peso debido a volatilización.
- 5.3. La sílica puede generar resultados positivos si al realizar la filtración pasa hacia el balón.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad; procedimiento 16 (PR 16) "Limpieza de materiales". Brevemente, lavar con jabón, enjuagar con agua de grifo y un último enjuague con hexano.
- 6.2. Recolectar aproximadamente 1000 mL de muestra en un frasco de vidrio de boca ancha. Si se estiman concentraciones altas de grasas, muestrear un volumen menor).

6.3. Acidificar a pH < 2 con HCl (1+1) o H₂SO₄ (1+1) en el mismo recipiente en el cual fue extraída la muestra en el momento del muestreo para evitar degradación si el análisis no puede ser llevado a cabo dentro de las 2 horas de extracción de la muestra. Refrigerar entre 0 y 6 °C. Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de extracción Soxhlet compuesto por balón de extracción de 300 mL de fondo chato, embudo Soxhlet y refrigerante
- 7.2. Equipo de filtración compuesto por bomba de vacío, embudo Buchner de 11 cm de diámetro, kitasato recolector de filtrado y trampa de agua
- 7.3. Plancha eléctrica de calentamiento para Soxhlet
- 7.4. Pinzas: una de más de 10 cm de largo metálica y otra con punta chata para tomar los cartuchos y el filtro, respectivamente
- 7.5. Cono de extracción de celulosa tipo Whatman 30 mm x 80 mm (D x h) o similar de acuerdo al tamaño del componente de extracción perteneciente al equipo
- 7.6. Papel de filtro de 11 cm de diámetro, Whatman N°40 o equivalente
- 7.7. Piedras porosas, de ebullición y/o cerámicas
- 7.8. Probeta de 1000 y 500 mL de vidrio o de plástico, vaso de bohemia de 250 mL de vidrio.
- 7.9. Balanza con resolución de 0,0001 g
- 7.10. Balanza de plato abierto
- 7.11. Equipo de evaporación de solvente (Rotavapor compuesto por baño de agua, ajuste de temperatura variable (entre 60 - 80 °C), condensador, balón recolector de solvente y trampa de agua para vacío y refrigeración del condensador o equipo similar)
- 7.12. Baño de hielo
- 7.13. Desecador
- 7.14. Estufa de secado para ser empleada a 103 °C
- 7.15. Vidrio reloj empleado para sostén de los filtros
- 7.16. Cápsula de porcelana o material similar donde alojar los cartuchos dentro de la estufa
- 7.17. Receptáculos para el almacenamiento del hexano ya utilizado
- 7.18. Cápsulas de cerámica donde colocar la sílica para su secado en la estufa
- 7.19. Barras magnéticas agitadoras recubiertas con TFE
- 7.20. Plancha eléctrica de calentamiento con agitador
- 7.21. Embudos de vidrio para filtración

8. REACTIVOS

- 8.1. n – Hexano [CH₃(CH₂)₄CH₃ Nro. CAS 110-54-3] 85 % mínima pureza, 99 % mínimo saturado en isómeros C6, residuo menor a 1 mg/L; destilar si es necesario.
- 8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) (1+1) o ácido sulfúrico (H₂SO₄ Nro. CAS 7664-93-9) (1+1). Ver Nota.
- 8.3. Sílica gel, 100 a 200 mesh. Secar a 110 °C por 24 h y almacenar en contenedor herméticamente cerrado.

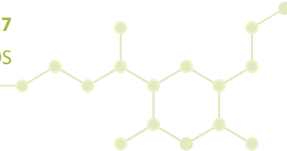
Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACION

- 9.1. No aplica.

10. CALIBRACION DEL METODO

- 10.1. No aplica.



11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Usar el procedimiento 2001UY para la determinación de aceites y grasas en las muestras y registrar en el RGC 01. Reservar estos balones en un desecador

Colocar la cantidad necesaria de balones vacíos, para la determinación de hidrocarburos en otro desecador. Dejar estabilizar hasta obtener peso constante

11.2. Pesar con balanza de precisión 0,1 mg (p3). Registrar el peso. (Se puede realizar vacío dentro de los desecadores con una bomba de vacío para llegar más rápido al peso constante).

11.3. Redisolver las grasas y aceites extraídas según procedimiento 2001UY en 90 mL de hexano. Si es necesario, calentar levemente para la total disolución de las grasas y aceites bajo campana de extracción.

11.4. Por cada 100 mg de grasas y aceites, adicionar 3,0 g de sílica gel, De ser necesario utilizar más de 30 g de sílica gel, realizar una dilución previa de las grasas y aceites, ya que más de 30 g de sílica pueden provocar interferencia positiva.

- Dilución primaria: transferir las grasas y aceites redisueltas en el punto 9.3 a un matraz aforado de 100 mL. Completar con hexano. Calcular el volumen que contiene 1000 mg de grasas y aceites según la siguiente ecuación:

$$V = \frac{1000 \times V_m}{M}$$

donde:

V: corresponde a volumen (mL) a extraer del matraz aforado de 100 mL

M: corresponde a masa de grasas y aceites (mg)

V_m: corresponde volumen (ml) de matraz aforado, en este caso 100 mL

Utilizando una pipeta aforada retirar el volumen calculado (V) y colocarlo en un balón. Diluir a aproximadamente 100 mL con hexano y agregar 30 g de sílica gel. Esta dilución debe ser considerada en el cálculo final de hidrocarburos, siendo:

$$FD = \frac{V_m}{V}$$

donde:

FD: corresponde a Factor de Dilución

11.5. Colocar una barra magnética agitadora en cada balón y agitar por 5 minutos en plancha dentro de campana de extracción.

11.6. Filtrar la solución con un papel de filtro pre-humedecido con hexano a los balones de extracción pesados en el punto 9.2. Enjuagar la sílica gel y el papel de filtro con 10 mL de hexano (para asegurar que todos los hidrocarburos pasaron a través del papel de filtro).

11.7. Evaporar el solvente del balón de extracción en el rotavapor con el baño de agua entre 60 – 65 °C. Para comprobar ausencia de solvente, realizar shock térmico en baño de hielo; si existe condensación del solvente continuar la evaporación y repetir el ensayo hasta no observar gotas de condensación.

11.8. Colocar el balón de extracción en un desecador hasta peso constante, pesar con precisión de 0,0001 g. (p4)

12. ANÁLISIS DE DATOS

$$\text{Hidrocarburos totales (mg/L)} = \frac{(p_4 - p_3) \times 1000 \times FD}{V}$$

donde:

p₃: corresponde a peso inicial del balón, vacío (mg)

p₄: corresponde a peso final del balón, luego de evaporación de solvente (mg)

V: corresponde a volumen (mL) de muestra filtrado en la determinación anterior de grasas y aceites

FD: corresponde a Factor de Dilución en caso que corresponda (ver 11.4)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

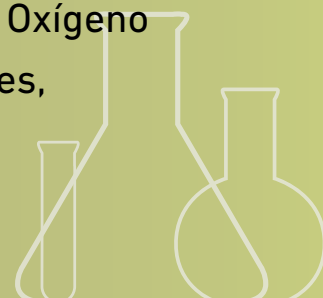
- 13.1. **Control de exactitud:** Se controla en cada serie de muestras el porcentaje de recuperación de una solución control, según lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico; verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico en el gráfico de control.
- 13.2. **Control de blancos:** Cada día de análisis se analiza un blanco de muestra; tomando como criterio de aceptación que el valor obtenido sea menor al límite de detección de la técnica.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the Examination of Water Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 5520 F Hydrocarbons pp. 5-44.
- 14.2. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1664, Revision A: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry (1999).

2007UY

Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en efluentes líquidos domésticos e industriales, aguas contaminadas y naturales.



Método respirométrico, sistema OXITOP®

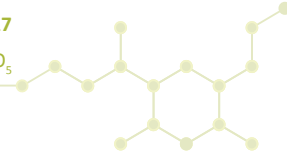
Elaborado - G. Pistone y M. Capandeguy

Modificado - No aplica

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda bioquímica de oxígeno en efluentes líquidos y aguas naturales. El límite de detección es de 4,6 mg O₂/L y el límite de cuantificación es de 14 mg O₂/L.

2. REFERENCIAS

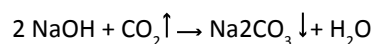
- 2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.6. Instructivo de uso desionizador Milli Q (INE 28)
- 2.7. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 16A)
- 2.8. Instructivo de uso balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 2.9. Instructivo de uso EQUIPO OxiTop® OC110 (INE 96)
- 2.10. Registro de Preparación de Reactivos y Estándares (RPR 02)
- 2.11. Registro de Preparación de Soluciones Control (RPS 09)
- 2.12. Registro de control de equipo (RCE 37 y RCE 112)
- 2.13. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.14. Ruta de análisis (RFQ 32)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) corresponde a la cantidad de oxígeno (expresada en mg/L) consumido por los microorganismos para la degradación bioquímica de la materia orgánica contenida en la muestra, durante un intervalo de tiempo específico y a una temperatura determinada. La medida de la DBO es, desde hace mucho tiempo, el método básico para determinar el grado de contaminación orgánica del agua.

El método respirométrico es el que mejor simula las condiciones reales bajo las cuales ocurre un proceso de degradación. En este método se mide el consumo de oxígeno de forma directa y continua a lo largo del tiempo. Al obtener datos de DBO en el mismo momento en que el proceso está teniendo lugar es posible un entendimiento más profundo de lo que ocurre en la muestra. Esto permite, además, la identificación inmediata de cualquier irregularidad o interferencia.

En este método, las muestras o diluciones adecuadas de las mismas se colocan en una botella dejando una cámara de aire y se incuban a (20 ± 1) °C durante 5 días. Por medio de agitación, el oxígeno presente en la cámara de la botella se disuelve en el líquido. Los microorganismos consumen el oxígeno durante el proceso de degradación de la materia orgánica, produciendo dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono reacciona con las pastillas de hidróxido de sodio (ubicadas en el vaso de caucho en la parte superior de la botella) según la siguiente reacción:



De esta forma, el dióxido de carbono (gas) es transformado en carbonato de sodio, produciéndose así un vacío dentro de la botella debido al consumo de oxígeno. Esta diferencia de presión es medida directamente por el sensor electrónico de presión ubicado dentro de los cabezales de medición OxiTop-C y transformada en el correspondiente valor de DBO según la siguiente ecuación:

$$DBO = \frac{M(O_2)}{R \cdot T_m} \cdot \left(\frac{V_b - V_m}{V_m} + \frac{T_m}{T_0} \right) \cdot \Delta p(O_2)$$

donde:

$M(O_2)$: corresponde al peso molecular del oxígeno (32000 mg/mol)

R: corresponde a la constante de los gases (83,144 L.hPa/(mol.K))

T_0 : corresponde a la temperatura (273,15 K)

T_m : corresponde a la temperatura de medición (293,15 K)

V_b : corresponde a la capacidad de la botella (510 mL)

V_m : corresponde al volumen de la muestra

$\Delta p(O_2)$: corresponde a la diferencia de presión que mide el sensor del cabezal

Es importante notar que este ensayo además de medir la degradación de materia orgánica (demanda carbonosa) también mide el oxígeno usado para oxidar material inorgánico como sulfuro e ión ferroso y formas reducidas de nitrógeno (demanda nitrogenada) a menos que esta oxidación sea prevenida por un inhibidor.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Utilizar guantes y túnica para el tratamiento de las muestras y el uso del inóculo bacteriano.

5. INTERFERENCIAS

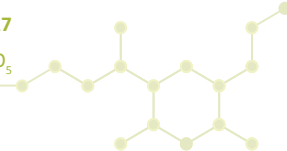
- 5.1. La producción de gases diferentes al CO_2 puede introducir errores en la medida de presión, disminuyendo la DBO. A su vez, sustancias que consumen oxígeno como compuestos de hierro II, sulfuro de hidrógeno o dióxido de azufre pueden aumentar la DBO.
- 5.2. La incompleta absorción de CO_2 puede introducir errores si la cantidad de NaOH absorbente no es suficiente.
- 5.3. Temperatura: el sistema OxiTop controla el inicio de la medición ya que tiene incluido un ajuste automático de la temperatura (función AutoTemp) que hace que la medición comience sólo cuando la temperatura se ha estabilizado en 20 °C. Esto lleva entre 1 y 3 horas. Por lo tanto, no es necesario termostatar las muestras exactamente a 20 °C para comenzar la medición. Sin embargo, para que esta función opere correctamente es necesario que la muestra se encuentre entre 15 °C y 21 °C.
- 5.4. Muestras que contienen cloro residual, metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos no permiten el desarrollo de bacterias que degradan la materia orgánica, y por lo tanto afectan el valor de DBO.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envases de plástico o vidrio de al menos 1 L de capacidad. Tomar la muestra y llenar el frasco evitando airear. Llenar el recipiente hasta el borde superior, sin cámara de aire.
- 6.2. Una vez colectada la muestra refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C) y comenzar el análisis preferentemente antes de las 6 h. De no ser esto posible, refrigerar y comenzar el análisis como máximo dentro de las 24 horas de la toma de muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora controlada termostáticamente a (20 ± 1) °C.
- 7.2. Bandeja de agitación magnética IS6.
- 7.3. Botellas de medición color ámbar de 510 mL de capacidad con sus respectivos cabezales de medición OxiTop-C (Marca WTW).
- 7.4. Vasos de caucho que se ajustan al cuello de las botellas.
- 7.5. Barras magnéticas agitadoras.



- 7.6. Controlador OxiTop OC 110 (WTW) con su respectivo software (Achat OC).
- 7.7. Pipeta automática de volumen variable (rango de 1 mL a 10 mL y 200 µL a 1000 µL)
- 7.8. Probetas graduadas de 100 mL.
- 7.9. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.10. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.11. Erlenmeyers de 500 mL.
- 7.12. Matraz aforado de 1000 mL.
- 7.13. pHímetro (anализador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

8.2. Reactivos:

- Absorbente de CO₂: pastillas de hidróxido de sodio (NHP 600, WTW)
- Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄ Nro. CAS 7778-77-0)
- Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄ Nro. CAS 7758-11-4)
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O Nro. CAS 7782-85-6)
- Cloruro de amonio (NH₄Cl Nro. CAS 12125-02-9)
- Cloruro de calcio (CaCl₂ Nro. CAS 10043-52-4)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O Nro. CAS 10034-99-8)
- Cloruro férrico hexahidratado [(FeCl₃)·6H₂O Nro. CAS 7705-08-0]
- Ácido sulfúrico o ácido clorhídrico concentrado (H₂SO₄ Nro. CAS 7664-93-9 o HCl Nro. CAS 7647-01-0)
- Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)
- D (+) glucosa anhidra (C₆H₁₂O₆ Nro. CAS 50-99-7)
- Ácido glutámico (C₅H₉NO₄ Nro. CAS 56-86-0)
- Inóculo Polyseed® (o similar)
- Sulfito de sodio (Na₂SO₃ Nro. CAS 7757-83-7)
- Almidón soluble [(C₆H₁₀O₅)_n Nro. CAS. 9005-25-8]
- Yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0)
- Ácido acético (C₂H₄O₂ Nro. CAS 64-19-7)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

8.3. Soluciones para ajuste de pH

- a) Solución ácida (H₂SO₄ o HCl, 1 N): diluir 28 mL de H₂SO₄ (concentrado) lentamente con agua destilada a 1 L, enfriando en baño de agua ó diluir 83 mL de HCl (concentrado) en aproximadamente 700 mL de agua y diluir a 1 L.
- b) Solución alcalina (NaOH, 1 N): disolver 40 g de NaOH en agua destilada y diluir a 1 L.

Nota 2: La cantidad de reactivo adicionado para la neutralización, no debe superar el 0,5 % del volumen a neutralizar. Si no se logra esto con las soluciones anteriores, realizarlos con otras más concentradas.

8.4. Soluciones de nutrientes

Almacenar refrigerada a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta un máximo de 6 meses en botellas de vidrio ámbar. Descartar en caso de apreciable crecimiento biológico o precipitación.

- a) Solución buffer fosfato pH 7,2: disolver 4,25 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 10,88 g de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), 16,7 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O) y 0,85 g de cloruro de amonio (NH₄Cl) en 250 mL de agua desionizada y diluir a 500 mL. El pH debe ser 7,2 sin ajustar. De lo contrario pesar 21,25 g de KH₂PO₄ y 0,85 g de NH₄Cl y agregar 350 mL de agua desionizada. Ajustar pH a 7,2 con NaOH. Completar a 500 mL con agua desionizada.

- b) Solución de sulfato de magnesio: disolver 11,25 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua desionizada y diluir a 500 mL.
- c) Solución de cloruro de calcio: disolver 13,75 g de cloruro de calcio (CaCl_2) en agua desionizada y diluir a 500 mL.
- d) Solución de cloruro férrico hexahidratado: disolver 0,13 g de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y diluir a 500 mL con agua desionizada.

Registrar en el envase la fecha de preparación de los reactivos y en el RPR correspondiente.

8.5. Inóculo

Inóculo bacteriano comercial (Polyseed[®] o similar): suspender el contenido de una cápsula de Polyseed en un Erlenmeyer con 500 mL de agua desionizada conteniendo 0,5 mL de cada una de las soluciones de nutrientes descritas en el punto 8.4. Agitar durante al menos 1 hora. Dejar decantar el sobrenadante (aserrín que actúa como carrier para los microorganismos) y transvasar la solución a un Erlenmeyer de 500 mL. La toma para inocular las botellas de DBO debe realizarse manteniendo agitación continua.

8.6. Solución ácido glutámico- glucosa

Secar la glucosa y el ácido glutámico de grado reactivo a 103 °C por 1 hora. Pesar 150,0 mg de glucosa y 150,0 mg de ácido glutámico en un matraz aforado de un litro. Completar con agua de dilución. De preferencia preparar cada día de análisis. De lo contrario almacenar refrigerada por no más de 24 horas. Dejar registro en el RPS correspondiente.

Nota 3: La glucosa y el ácido glutámico pueden tardar algún tiempo en disolverse y esto puede acelerarse calentando suavemente o sonicando la solución.

8.7. Reactivos para muestras cloradas

- a) Solución de sulfito de sodio 0,025 N: disolver 0,1575 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.
- b) Solución de yoduro de potasio: disolver 10 g de yoduro de potasio (KI) en 100 mL de agua destilada.
- c) Solución indicadora de almidón: a 5 g de almidón se agrega un poco de agua fría y se tritura en un mortero hasta obtener una pasta fina. Se agrega 1 L de agua destilada hirviendo, se agita bien y se deja en reposo durante una noche. Utilizar el sobrenadante transparente, conservar con 1,25 g de ácido salicílico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ Nro. CAS 69-72-7), o 4 g de cloruro de zinc (ZnCl_2 Nro. CAS 7646-85-7) o una combinación de 4 g de propionato de sodio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_2$ Nro. CAS 137-40-6) y 2 g de azida de sodio (NaN_3 Nro. CAS 26628-22-8) por litro de solución de almidón. Mantener a 4 °C.
- d) Solución de ácido acético 1+1, o de ácido sulfúrico 1+50

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

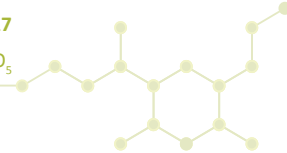
Operaciones previas

11.1. Ajuste de pH de la muestra (si corresponde):

Si el pH de la muestra se encuentra fuera del rango 6,0 - 9,0; neutralizar la fracción de la muestra a incubar empleando H_2SO_4 1 N (o HCl 1 N) o NaOH 1 N (ver punto 8.3) de forma que su pH final se encuentre dentro de dicho rango. Dejar registro en la ruta de análisis que se realizó corrección de pH. La cantidad de reactivo agregado no debe diluir la muestra en más de 0,5 %.

11.2. Neutralización del cloro residual (si corresponde):

Para muestras cloradas se debe neutralizar el cloro previamente a la inoculación de la muestra. El registro de la existencia original de cloro en la muestra se encuentra establecido en la ficha de ingreso correspondiente. Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. En las



que persiste, proceder como sigue:

- Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1+1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50.
- Adicionar 1,0 mL de solución de KI
- Titular con solución de Na₂SO₃ hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución. Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.
- Tomar Gasto Total.
- Al poner la porción de la muestra a analizar en la botella de medición, adicionar a la misma la cantidad de Na₂SO₃ necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descripta. Para lograr esto, prepararla en un matraz y luego repartir en las botellas de DBO. El volumen a adicionar de solución de Na₂SO₃ se calcula de la siguiente manera:

$$V_{Na_2SO_3} = (G_{Na_2SO_3} \times V_{muestra}) / 100$$

Nota 4: el agregado de exceso de solución de Na₂SO₃ produce consumo de oxígeno, por lo tanto debe ser agregado solamente en la cantidad necesaria.

Determinación de DBO₅ en aguas naturales.

11.3. En este tipo de aguas no es necesario el agregado externo de microorganismos.

Se excluyen de este procedimiento aquellas muestras cuyo pH esté fuera del rango 6-9 porque en ese caso es muy probable que la actividad microbiana se encuentre alterada, lo que arrojaría resultados falsos. Por lo tanto estas muestras deben ser tratadas como efluentes líquidos (ver 10.4).

Usar el valor de DQO para estimar el valor de la DBO y en función de esto seleccionar el rango y el volumen adecuado como se muestra en la **Tabla 1**. Si no se conoce la relación entre la DQO y la DBO asumir que la DBO es aproximadamente 3 veces menor que la DQO.

- Homogeneizar la muestra y colocar el volumen adecuado (por peso) directamente en la botella de medición color ámbar de 510 mL. Agregar 1 mL de cada uno de los cuatros nutrientes.
- Insertar una barra magnética en cada botella.
- Termostatar la muestra entre 15 °C y 21 °C.
- Usando pinzas colocar dos pastillas de hidróxido de sodio en el vaso de caucho e insertar éste en el cuello de la botella. Los vasos de caucho también cumplen la función de asegurar un cierre hermético con los cabezales.
- Cerrar herméticamente la botella con los cabezales de medición OxiTop-C.
- Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC 110 (ver INE 96).
- Colocar las botellas de medición en la plataforma de agitación dentro de la incubadora.
- Enchufar el motor de la plataforma una vez que todas las botellas hayan sido colocadas.
- Incubar las muestras por 5 días a (20 ± 1) °C.
- Incubar junto con las muestras, los controles de calidad correspondientes (ver cap. 12)
- Luego de 5 días leer los valores de DBO (se obtienen directamente del controlador en mg O₂/L). No es necesario ningún cálculo posterior (ver 11.1)

Tabla 1

| DBO estimada (mg/L) | Volumen de muestra (mL) | Volumen total de nutrientes (mL)* | Volumen final de la botella (mL) |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0-40 | 428 | 4 | 432 |
| 0-80 | 361 | 4 | 365 |

*Se agrega 1 mL de cada uno de los nutrientes (ver 8.4)

Determinación de DBO₅ en efluentes líquidos.

11.4. Para poder medir la DBO en este tipo de muestras se les debe agregar nutrientes y microorganismos.

Usar el valor de DQO para estimar el valor de la DBO y en función de esto seleccionar el rango y el volumen adecuado como se muestra en la **Tabla 2**. Si no se conoce la relación entre la DQO y la DBO asumir que la DBO es aproximadamente 3 veces menor que la DQO. Si el valor estimado de DBO es mayor a 800 mg O₂/L, se realiza una dilución primaria, 1:10 (por peso), en un matraz aparte, y se toma una porción adecuada de dicha dilución. Dejar registro en la ruta de análisis.

- Homogeneizar la muestra y colocar el volumen elegido (por peso) directamente en la botella de medición color ámbar de 510 mL. Agregar 10 mL del inóculo bacteriano y 1 mL de cada uno de los cuatro nutrientes.
- Insertar una pastilla magnética a cada botella.
- Termostatar la muestra entre 15 °C y 21 °C.
- Con la ayuda de unas pinzas insertar dos pastillas de hidróxido de sodio en los vasos de caucho y colocar éstos en el cuello de la botella. Los vasos de caucho también cumplen la función de asegurar un cierre hermético con los cabezales.
- Cerrar las botellas fuertemente con los cabezales de medición OxiTop.
- Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC 110 (ver INE 96).
- Colocar las botellas de medición en la plataforma de agitación dentro de la incubadora.
- Enchufar el motor de la plataforma una vez que todas las botellas hayan sido colocadas.
- Incubar las muestras por 5 días a (20 ± 1) °C.
- Junto con las muestras incubar los controles de calidad correspondientes (ver cap. 12)
- Luego de 5 días leer los valores de DBO (se obtienen directamente del controlador en mg O₂/L) y realizar los cálculos correspondientes (ver 11.2).

Tabla 2

| DBO estimada (mg/L) | Volumen de muestra (mL) | Volumen de inóculo (mL) | Volumen total de nutrientes (mL)* | Volumen final de la botella (mL) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0-40 | 418 | 10 | 4 | 432 |
| 0-400 | 150 | 10 | 4 | 164 |
| 0-800 | 83 | 10 | 4 | 97 |

*Se agrega 1 mL de cada uno de los nutrientes (ver 8.4)

12. ANALISIS DE DATOS

12.1. Aguas naturales

En este caso la medida de DBO es la que se lee directamente del controlador OxiTop OC 110 en mg/L. No es necesario restarle el valor del control de siembra (ver capítulo 12) ni corregir por un factor de dilución ya que la muestra no fue inoculada ni diluida.

12.2. Efluentes líquidos

En el caso de los efluentes industriales, la DBO₅ de la muestra se calcula como:

$$DBO_5 = \left[(DBO_5 \text{ muestra} - \frac{DBO_5 \text{ siembra} \times \text{Vol siembra}}{\text{Vol control de siembra}}) \times \frac{\text{Vol final}}{\text{Vol muestra}} \right] \times \text{FD}$$

Fórmula 1

donde:

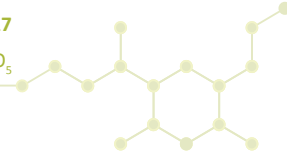
DBO₅: muestra corresponde al valor de DBO leído directamente del controlador en mg O₂/L al día 5.

DBO₅: siembra corresponde al valor de DBO del control de siembra leído directamente del controlador.

Vol: siembra corresponde al volumen de siembra agregado en la botella donde se incubó la muestra (10 mL)

Vol: control siembra corresponde al Volumen de siembra utilizado en el control de siembra (160 mL)

Vol: final corresponde al Volumen total de la botella donde se incubó la muestra.



Vol: muestra corresponde al Volumen de la muestra incubado en la botella

FD: en caso de realizar una dilución primaria se debe multiplicar por este factor (ej. dilución 10 en 100,

FD = 100/10 = 10)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

13.1. Control de siembra: Este control se realiza para calcular la DBO del inóculo bacteriano. Este valor debe ser restado al valor de DBO de las muestras de efluentes líquidos y de la solución control de ácido glutámico-glucosa.

Colocar 160 mL de la suspensión Polyseed en una botella de medición y 1 mL de cada una de las cuatro soluciones de nutrientes

Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC110, especificando el rango de medición de 0-400 ya que el volumen final de la botella es de 164 mL.

13.2. Control ácido glutámico - glucosa: Este control permite verificar la efectividad de los microorganismos y del sistema de medición, por lo que debe hacerse de rutina cada vez que se incuben muestras.

Preparar la solución como se indica en el punto 8.6. Transferir 150 mL de esta solución a una botella de medición y agregar 10 mL de la suspensión de microorganismos Polyseed y 1 mL de cada una de las cuatro soluciones de nutrientes (el volumen final de la botella debe ser 164 mL).

Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC110, especificando un rango de medición de 0-400 ya que el volumen final de la botella es de 164 mL.

Leer el valor de DBO₅ en mg O₂/L directamente del controlador. Realizar los siguientes cálculos para corregir este valor por la dilución efectuada y por el consumo de oxígeno del control de siembra:

$$DBO_5 = (DBO_5 \text{ GGA} - \frac{DBO_5 \text{ siembra} \times \text{Vol siembra}}{\text{Vol control de siembra}}) \times \frac{\text{Vol final}}{\text{Vol GGA}} \quad \text{Fórmula 2}$$

donde:

DBO₅ GGA: corresponde al valor de DBO de la solución control de ácido glutámico-glucosa leído directamente del controlador en mg O₂/L al día 5.

DBO₅: Siembra corresponde al valor de DBO del control de siembra leído directamente del controlador en mg O₂/L al día 5

Vol siembra: corresponde al volumen de siembra agregado en la botella donde se incubó la muestra (10 mL)

Vol. control siembra: corresponde al volumen de siembra utilizado en el control de siembra (160 mL)

Vol. final: corresponde al volumen total de la botella donde se incubó la muestra (164 mL)

Vol. GGA: corresponde al volumen de GGA utilizado para este control (150 mL)

El valor final de la solución control GGA debe ser de (198 ± 30,5) mg O₂/L para poder considerar la performance biológica y el funcionamiento del sistema aceptable. Se debe llevar registro en gráfico de control correspondiente.

14. BIBLIOGRAFIA

14.1. System OxiTop Control®, Manual de Operación.

14.2. Determination of Biochemical Oxygen Demand (BOD), WTW. (páginas 4-37)

14.3. "Supervision of BOD measuring systems according to DIN/ISO 9000 and GLP" WTW Application Report 2010

14.4. "Respirometric BOD5 determination of domestic waste water" WTW Application Report 2010

14.5. "Respirometric BOD5 determination of waste water polluted with organic or inorganic toxins or inhibitors" WTW Application Report 2010

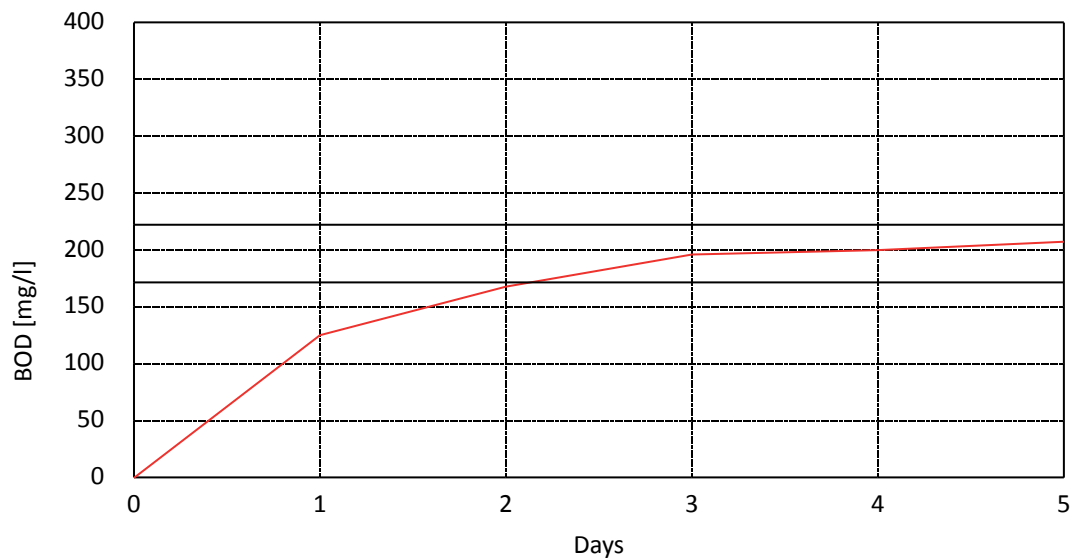
14.6. Instrucciones de uso inóculo bacteriano Polyseed o similar.

ANEXO I

Interpretación de gráficos

Curva Ideal

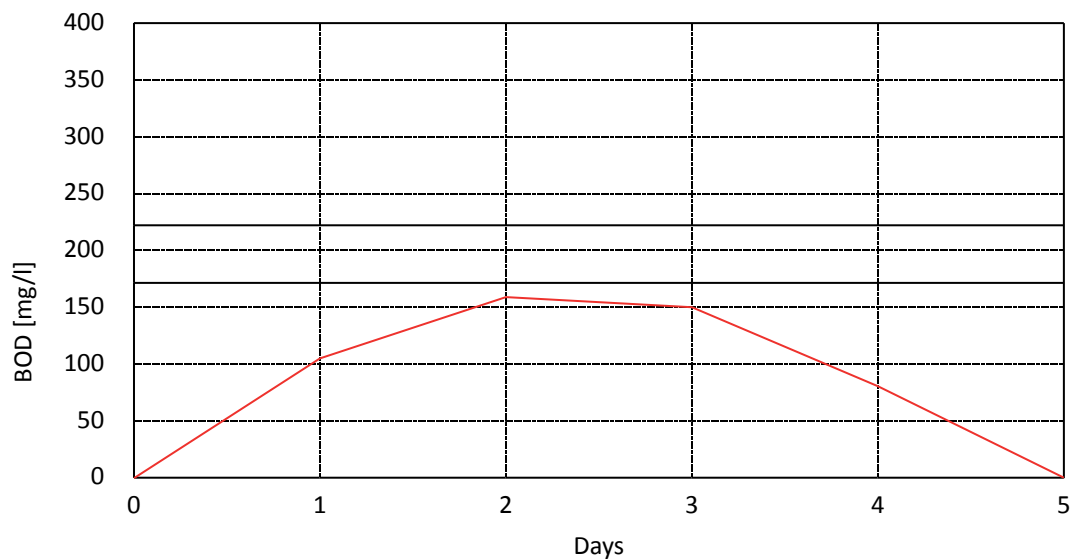
Graphic evaluation as BOD-Chart



En esta gráfica se muestra la curva ideal para la medida de DBO (ejemplo dado para la solución control de ácido glutámico-glucosa).

Sistema con fugas

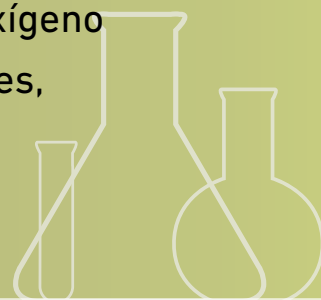
Leaking measuring system



El sistema presenta fugas. Reemplazar el vaso de caucho o los cabezales de medición. También puede ser que no se haya colocado la cantidad suficiente de pastillas de hidróxido de sodio.

2008UY

Determinación de Demanda Bioquímica de Oxígeno en efluentes líquidos domésticos e industriales, aguas contaminadas y naturales.



Método electrométrico

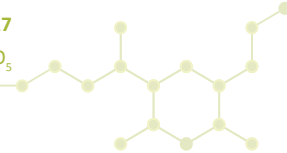
Elaborado - F. Lauber

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda bioquímica de oxígeno en efluentes líquidos domésticos e industriales, aguas contaminadas y naturales en el rango entre 1,3 mg O₂/L y 6.000 mg O₂/L. El límite de detección es de 0,42 mg O₂/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RFQ 06)
- 2.6. Registro de Preparación de Reactivos y Estándares (RPR 02)
- 2.7. Registro de Preparación de Soluciones Control (RPS 09)
- 2.8. Registro de control de equipo (RCE 57 / 112)
- 2.9. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.10. Instructivo de equipos desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.11. Instructivo de uso analizador de iones Orion (INE 08)
- 2.12. Instructivo de uso analizador de iones WTW (INE 63)
- 2.13. Instructivo de uso desionizador Mili Q (INE 28)
- 2.14. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16A)
- 2.15. Instructivo de uso balanza analítica (INE 94)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) corresponde a la cantidad de oxígeno consumido para la degradación bioquímica de la materia orgánica contenida en la muestra (demanda carbonosa), durante un intervalo de tiempo específico y a una temperatura determinada. La muestra o diluciones adecuadas de la misma en un frasco sin cámara de aire, se incuban a 20 °C ± 1 °C durante 5 días. El Oxígeno Disuelto (OD) se mide antes y después de los 5 días de incubación y la DBO₅ se determina por la diferencia entre el OD inicial y final.
- 3.2. Además de la degradación de materia orgánica (demanda carbonosa), el ensayo mide también la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar material inorgánico como sulfuros e ión ferroso, y formas reducidas de nitrógeno como amonio y nitrógeno orgánico (demanda nitrogenada), a menos que se emplee un inhibidor de nitrificación para prevenir su oxidación.

Por lo tanto, si no se emplea un inhibidor, la demanda de oxígeno medida es la suma de las demandas de carbono y de nitrógeno.

Factores como la presencia de materia orgánica soluble y particulada, sólidos flotables y sedimentables, oxidación de sulfuros e ión ferroso, o falta de agitación, afectan la precisión y exactitud de la medida de DBO. Actualmente no existe manera de corregir los efectos de dichos factores.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Utilizar guantes, lentes de seguridad y túnica para el tratamiento de las muestras y el uso del inóculo bacteriano.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Muestras que contienen cloro residual, metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos no permiten el desarrollo de bacterias que degradan la materia orgánica.
- 5.2. Alto contenido de peróxido de hidrógeno (que pueden encontrarse en efluentes con procesos industriales de blanqueo; papeleras y plantas textiles), puede causar niveles de oxígeno iniciales supersaturados, e interferir con el valor obtenido de DBO.
- 5.3. Muestras de agua provenientes de lugares fríos o con alta producción de fotosíntesis pueden causar niveles de oxígeno iniciales supersaturados, e interferir con el valor obtenido de DBO.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o similar). Tomar la muestra y llenar el frasco evitando airear. Llenar el recipiente hasta el borde superior sin cámara de aire. El volumen de muestra típica es de 500 mL.
- 6.2. Realizar el análisis inmediatamente, si no es posible refrigerar la muestra a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) y comenzar el análisis antes de las 24 horas de recolección.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

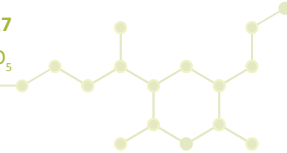
- 7.1. Incubadora controlada termostáticamente a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Excluir toda luz para prevenir la posibilidad de producción de oxígeno por fotosíntesis.
- 7.2. Botellas de incubación de 300 mL de capacidad, preferentemente con sello de agua y tapón de plástico
- 7.3. Electrodo de membrana selectiva al oxígeno, con compensación automática de temperatura y barra agitadora incorporada (WTW Inolab o similar). (Pilas V357 de preferencia o similar, de forma que aseguren buena diferencia de potencial)
- 7.4. Analizador de iones (WTW Inolab o similar)
- 7.5. Agitador magnético
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable (rango de 1 mL a 10 mL y 200 μL a 1000 μL).
- 7.7. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.8. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.9. Matraces
- 7.10. Probetas graduadas de 100 mL
- 7.11. Recipiente para el agua de dilución (Nalgene de 20 L de capacidad o similar)
- 7.12. Canastas para transporte de botellas de incubación.
- 7.13. Vasos de Bohemia

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente) para la preparación de las soluciones. Debe cumplir de los controles de calidad del método, establecidos en el punto 13.
- 8.2. **Soluciones para ajuste de pH:** soluciones ácida (H_2SO_4 Nro. CAS 7664 -93-9) y alcalina (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) de concentración 1 N para neutralización de muestras cáusticas o ácidas.
 - a) Solución ácida: diluir 28 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 (cc) lentamente con agua desionizada a 1 L, enfriando en baño de agua.
 - b) Solución alcalina: disolver 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua desionizada y diluir a 1 L.

Nota 1: La cantidad de reactivo adicionado para la neutralización, no debe superar el 0,5 % del volumen a neutralizar. Si no se logra esto con las soluciones anteriores, realizarlos con otras más concentradas.

- 8.3. **Soluciones de nutrientes:** almacenar refrigerada a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$) hasta un máximo de 6 meses. Descartar en caso de apreciable crecimiento biológico o precipitación. Dejar registro de su pre-paración. Las soluciones de nutrientes pueden ser esterilizadas en autoclave para proveer una mayor duración de las mismas (pág. 5 - 5, APHA, 22 ed.)
 - a) Solución buffer fosfato: disolver 4,25 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), 10,875 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4), 16,7 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7782-85-6) y 0,85 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en 250 mL de agua desionizada y diluir a 500 mL. El pH debe ser 7,2 sin ajustar. De lo contrario pesar 21,25 g de KH_2PO_4 y 0,85 g de NH_4Cl y agregar 350 mL de agua desionizada. Ajustar pH a 7,2 con NaOH. Completar a 500 mL con agua desionizada.
 - b) Solución de sulfato de magnesio: disolver 11,25 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10034-99-8) en agua desionizada y diluir a 500 mL.
 - c) Solución de cloruro de calcio: disolver 13,75 g de cloruro de calcio (CaCl_2 Nro. CAS 10043-52-4) en agua desionizada y diluir a 500 mL.



c) Solución de cloruro férrico: disolver 0,125 g de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10025-77-1) y diluir a 500 mL con agua desionizada.

8.4. Inóculo

Para efluentes industriales se puede usar como inóculo una de las siguientes opciones:

- Muestra de un efluente no clorado proveniente del mismo ramo de industria (500 μL de efluente por botella de incubación).
- Inóculo bacteriano comercial (Polyseed® o similar): Suspender el contenido de una cápsula en 500 mL de agua de dilución durante 1 hora con agitación constante. Dejar decantar el sobrenadante (aserrín que actúa como carrier para los microorganismos), y transvasar la solución a un matraz adecuado. La toma para inocular las botellas de DBO debe realizarse manteniendo agitación continua. De preferencia utilizar en el mismo día de preparada, luego descartar. En todos los casos, mantener refrigerada a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$) y no utilizar más allá de las 24 h de preparada.

8.5. Reactivos para muestras cloradas

- Solución de sulfito de sodio 0,025 N: disolver 0,1575 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7) en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.
- Solución de yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0): disolver 10,00 g de KI en 100 mL de agua desionizada.
- Solución indicadora de almidón: 5 g de almidón [$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ Nro. CAS 9005-25-8] en 1 L de agua desionizada. Prepararla en forma diaria.
- Solución de ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ Nro. CAS 64-19-7 1+1, o de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 1+50.

8.6. **Solución control de ácido glutámico - glucosa:** Preparar la solución de control conteniendo: 150,0 mg de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ Nro. CAS 50-99-7) + 150,0 mg de ácido glutámico ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ Nro. CAS 56-86-0), en 1000 mL de agua desionizada. Previo a la pesada, secar la glucosa y el ácido glutámico de grado reactivo a $103\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora. Dejar registro. De preferencia prepararla en forma diaria. Puede almacenarse refrigerada a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$) por un máximo de 24 horas.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL METODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

11.1. Preparación del agua de dilución (prepararla el mismo día de su uso):

En el recipiente de agua de dilución, tomar el volumen necesario de agua desionizada dejando como mínimo una cámara de aire que corresponda al 20 % del volumen total del recipiente, para permitir una adecuada agitación. Agregar 1 mL por litro de agua de las siguientes soluciones de nutrientes: buffer fosfato, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, y cloruro férrico. Agitar vigorosamente el recipiente para permitir la oxigenación del agua de dilución. Termostatar a $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ el agua de dilución previo a su uso. El contenido de oxígeno debe ser de al menos 7,5 mg O_2/L , y es recomendable que se sitúe entre 8,0 y 9,0 mg O_2/L .

11.2. Ajuste de pH de la muestra (si corresponde):

Si el pH de la muestra se encuentra fuera del rango de pH 6,0 – 8,0, neutralizar la fracción de la muestra a incubar empleando H_2SO_4 o NaOH de forma que su pH final se encuentre entre 7,0 -7,2. Debe quedar registro que se realizó corrección de pH. La cantidad de reactivo no debe diluir la muestra en más de 0,5 %.

11.3. Neutralización del cloro residual (si corresponde):

Para muestras cloradas se debe neutralizar el cloro previamente a la inoculación de la muestra. El registro de la existencia original de cloro en la muestra se encuentra establecido en el registro de ingreso correspondiente a la misma, la cual es consultada previo a la realización del análisis. Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. En las que persiste, proceder como sigue:

- a) Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.
- b) Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1 + 1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50.
- c) Adicionar 1,0 mL de solución de KI.
- d) Titular con solución de Na₂SO₃ hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución.
Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón (5 g de almidón por litro de agua) y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.
- e) Registrar el gasto total de solución de Na₂SO₃.
- f) Al poner la porción de la muestra a analizar en la botella de DBO, adicionar a la misma la cantidad de Na₂SO₃ necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descrita. Para lograr esto, prepararla en un matraz y luego repartir en las botellas de DBO. El volumen a adicionar de solución de Na₂SO₃ se calcula de la siguiente manera:

$$V_{\text{Na}_2\text{SO}_3} = (G_{\text{Na}_2\text{SO}_3} \times V_{\text{muestra}}) / 100$$

Se mezcla y se deja en reposo 20 min. Chequear la presencia de cloro residual.

Nota 2: el agregado de exceso de solución de Na₂SO₃ produce consumo de oxígeno, por lo tanto debe ser agregado solamente en la cantidad necesaria.

11.4. Remoción de peróxido de hidrógeno (si corresponde):

Agitar las muestras vigorosamente en un recipiente abierto durante aprox. 1-2 horas para permitir la disipación del peróxido de hidrógeno. Chequear la remoción del mismo observando la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo, o usando tiras reactivas específicas para peróxido. Se considera completa la reacción de remoción cuando durante un intervalo de 30 minutos en reposo, no se observa incremento del oxígeno en la muestra. Si a pesar del tratamiento, el peróxido persiste, trabajar con muestra diluida.

11.5. Muestras supersaturadas en OD (si corresponde):

En muestras con niveles de oxígeno disuelto por encima del punto de saturación a 20 °C y 760 mmHg de presión, 9,2 mg O₂/L (aguas muy frías o con alta producción de fotosíntesis), reducir el oxígeno dejándola en recipiente abierto, completo hasta la mitad, y agitando vigorosamente de vez en cuando, antes de su análisis.

Análisis de la muestra

Muestras que no contienen cantidad suficiente de población microbiana (por ejemplo efluentes industriales):

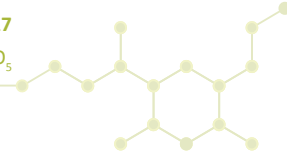
11.6. Estimación de las diluciones:

Realizar al menos 4 diluciones de la muestra. La estimación de la DBO₅ puede realizarse en base a alguna de las siguientes maneras:

- a) Valor de DQO de la muestra. Tomando en cuenta el promedio de las relaciones históricas DQO/DBO₅ y el valor de DQO actual, estimar el valor de DBO₅ de la muestra. Con dicho valor, en la Tabla "DBO estimada/Toma" (ver punto 13. Anexo), realizar las diluciones con aquellos volúmenes correspondientes al valor inmediatamente anterior y posterior al valor estimado, y el tercer o cuarto volumen anterior y posterior a la DBO estimada en un principio. Para casos de DBO estimada menor a 15 mg O₂/L, se aconseja tomar los siguientes volúmenes: 50, 100, 150, y 200 mL.
- b) Si no se cuenta con un valor estimado de DBO₅, realizar diluciones en los siguientes rangos:
 - 0,01 - 1 % para desechos industriales cargados.
 - 1 a 5 % para efluentes industriales no tratados.
 - 5 - 25 % para efluentes tratados biológicamente.
 - 25 - 100 % para aguas naturales contaminadas.

11.7. Preparación de las diluciones e incubación:

Termostatar la muestra a 20 °C ± 3 °C. Realizar al menos 4 diluciones por muestra. Homogeneizarla y realizar la toma para las diluciones vertiendo directamente por las paredes internas de las botellas de DBO, empleando pipeta automática de volumen variable. Para los casos que se requiera realizar una dilución intermedia (10:100) por peso antes de realizar la dilución final en la botella. Dejar registro en la ruta de análisis.



Completar 2/3 de la botella de DBO con agua de dilución evitando airear.

Agregar a cada botella de incubación 3 mL de solución de inóculo (según instrucciones del fabricante), agitando continuamente para asegurar que la misma cantidad de microorganismos se agregue a cada botella.

Completar las botellas con el agua de dilución evitando airear, golpear las botellas suavemente de forma que al cerrarlas se hayan desplazado todas las burbujas de aire.

Medir el oxígeno disuelto inicial dentro de los 30 minutos de realizada la dilución.

Dejar sello de agua al tapar la botella, y colocar tapón de plástico para evitar evaporación del agua durante la incubación.

Incubar las botellas de DBO a 20 °C ± 1 °C, durante 5 días ± 6 horas.

Luego de finalizado el período de incubación medir el oxígeno disuelto final de todas las botellas incubadas. Seguir las instrucciones de uso del electrodo que figuran junto al equipo.

11.8. Control de calidad. Junto con las diluciones de las muestras incubar los siguientes controles:

- una botella con el blanco de dilución: conteniendo solamente agua de dilución.
- cuatro botellas para el control de siembra (o según instrucciones del fabricante del inóculo comercial): agregar a cada botella un volumen adecuado de la solución de inóculo comercial (Polyseed® o similar) preparada según el punto 8.4.b. Completar con agua de dilución. Con estas botellas se calcula el Factor de Control de Siembra (SFC) que se utiliza para calcular la DBO de las muestras.

Nota 3: Se sugiere el empleo de 5, 7, 10 y 12 mL de siembra de forma tal que se produzca una reducción del OD de al menos 2,0 mg O₂/L, y que contengan una cantidad de OD residual de al menos 1,0 mg O₂/L, después de 5 días de incubación. En caso que los volúmenes no cumplan con el requisito anterior, ajustar los mismos.

- tres botellas con solución control: conteniendo 6 mL de la solución control de ácido glutámico - glucosa (GGA), 3 mL de la solución de inóculo, y agua de dilución.

Al igual que el resto de las muestras, leer el oxígeno disuelto inicial previo a la incubación y luego de los 5 días ± 6 horas.

Realizar al menos una muestra por duplicado (para cada dilución), por día de análisis.

Muestras que contienen cantidad suficiente de población microbiana (ej: aguas naturales):

11.9. Procedimiento:

Colocar parte de la muestra en una botella de DBO. Agregar 0,3 mL de las soluciones de nutrientes. Luego completar la botella con la muestra, evitando airear.

Medir el oxígeno disuelto inicial de la muestra en la botella de incubación, con el electrodo de oxígeno, y dejar registro en ruta de análisis.

Dejar sello de agua al tapar la botella, y colocar tapón de goma para evitar evaporación del agua durante la incubación.

Incubar las botellas de DBO a 20 °C ± 1 °C, durante 5 días ± 6 horas.

Realizar las lecturas del oxígeno disuelto al cabo de ese tiempo.

11.10. Control de calidad. Para el caso de aguas naturales debe ser incubado un duplicado por cada día de análisis.

Realizar control de blanco, al igual que 11.8. No requiere controles de siembra, ni solución control (GGA).

12. ANÁLISIS DE DATOS

Solamente se consideran como válidas aquellas botellas en las cuales se produjo una reducción del OD de al menos 2,0 mg O₂/L, y que contengan una cantidad de OD residual de al menos 1,0 mg O₂/L, después de 5 días de incubación.

2,0 mg O₂/L es la mínima cantidad que se requiere para producir una medida válida de OD, y se necesita al menos 1,0 mg O₂/L remanente para asegurar que la tasa de oxidación de la materia orgánica no se vea afectada por falta de oxígeno.

12.1. Para muestras de efluentes industriales (punto 11.6):

$$DBO_5 \text{ (mg O}_2\text{/L)} = [(OD_{\text{inicial}} - OD_{\text{final}}) - \text{prom SCF}] \times (300 / V_m)$$

donde:

OD_{inicial}: Oxígeno disuelto inicial (mg/L) de la muestra diluida

OD_{final}: Oxígeno disuelto final (mg/L), al cabo de 5 días de incubación de la muestra diluida

Volumen total botellas: 300mL

V_m: volumen de la muestra en la dilución

Prom SCF: Factor de Control de Siembra promedio. Ver punto 13.2

Se promedia el valor de DBO₅ de todas las botellas que cumplen con el criterio de validez indicado arriba. Se deben tener como válidos al menos 2 valores de forma tal de poder realizar el promedio y el cálculo del rango normalizado. En caso contrario, repetir el análisis informando el valor obtenido en forma estimada.

Si todas las botellas presentan un OD residual menor a 1,0 mg O₂/L, se selecciona la botella con la mayor dilución (la que presenta menor concentración de OD), y se calcula con ésta la DBO₅ estimada (se expresa como DBO > a dicho valor). Repetir el análisis a efectos de poder informar un valor más certero.

12.2. Para muestras de aguas naturales (punto 11.9):

En este caso no se agrega siembra, por lo que:

$$DBO_5, \text{ mg O}_2\text{/L} = (OD_{\text{inicial}} - OD_{\text{final}})$$

donde:

OD_{inicial}: concentración de oxígeno de la muestra antes de la incubación

OD_{final}: concentración de oxígeno de la muestra luego de los 5 días de incubación

Para estas muestras no es necesario tener una depleción de OD de al menos 2,0 mg O₂/L.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Blanco:** El consumo de oxígeno en el blanco de dilución sin siembra al cabo de los 5 días de incubación debe ser menor o igual al LD del método. Este blanco sirve, fundamentalmente, para chequear la calidad del agua de dilución y la limpieza de los materiales utilizados en el procedimiento, como ser las botellas de incubación.

13.2. **Control de siembra:** El Factor de Control de Siembra (SFC) promedio, calculado a partir de las cuatro botellas conteniendo distintas diluciones de la solución de inóculo comercial y agua de dilución, debe tener un coeficiente de variación (C.V.) menor a 30 %. En caso que el fabricante establezca límites de consumo de oxígeno para la siembra, como en el caso de Polyseed, chequear cumplimiento respecto a dichos límites.

El SFC se calcula según la siguiente ecuación:

$$SCF = (B1 - B2) \times F$$

donde:

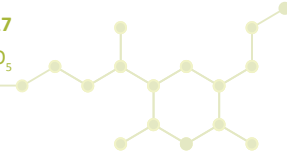
B1: OD del control de siembra antes de la incubación (mg/L)

B2: OD del control de siembra después de la incubación (mg/L)

F: volumen de siembra que se colocan en las botellas conteniendo las muestras (3 mL)/ volumen de siembra colocado en cada botella de control de siembra.

13.3. **Control de la exactitud:** El valor promedio de DBO de las 3 soluciones control incubadas junto a cada serie de muestras, debe dar entre 198 mg O₂/L ± 30,5 mg O₂/L; en caso contrario repetir el batch de análisis e informar valores estimados por control de calidad. En el caso que al repetir el análisis se obtenga un valor de DBO de la muestra dentro del rango de incertidumbre aceptado para la metodología comparado con el primer valor obtenido, informar el valor resultante en primera instancia, sin necesidad de que sea informado como estimado.

- Valores de DBO mayores al rango de aceptación, indican el uso de mayor cantidad de inóculo, agua de dilución contaminada, o la presencia de microorganismos nitrificadores



- Valores de DBO menores al rango de aceptación pueden indicar mala calidad del inóculo o menor cantidad del mismo, o la presencia de tóxicos.

$$DBO_5 \text{ (mg O}_2\text{/L)} = [(OD_{\text{inicial}} - OD_{\text{final}}) - \text{prom SCF}] \times (300 / 6)$$

donde:

OD_{inicial}: corresponde a Oxígeno disuelto inicial (mg/L) de la solución control

OD_{final}: corresponde a Oxígeno disuelto final (mg/L), al cabo de 5 días de incubación de la solución control

Volumen total botellas: 300 mL

Vm: corresponde al volumen de la solución control: 6mL.

Prom SCF: corresponde al Factor de Control de Siembra promedio. Ver punto 13.2

Registrar el valor de DBO obtenido con la solución control, en el gráfico de control de exactitud.

- 13.4. **Control de la precisión:** El rango normalizado de los distintos valores de DBO5 pertenecientes a una misma serie de diluciones de una muestra tomados en cuenta para el cálculo, no debe ser mayor al 30 %. Dejar registro en el gráfico de control de precisión, construido según el manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

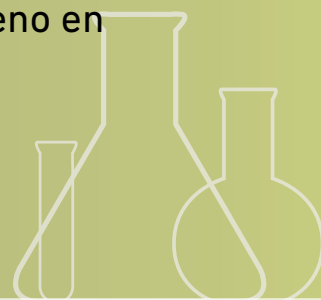
- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 5210 B Biochemical oxygen demand (BOD) 5-Day BOD Test pp. 5-5 a 5-10.
- 14.2. Instrucciones de uso del inóculo bacteriano (Polyseed® o similar).

Anexo: Tabla "DBO estimada/Toma"

| DBO estimada | Dilución | Toma (mL) |
|--------------|----------|-----------|
| 10 | ----- | 120 |
| 20 | ----- | 60 |
| 30 | ----- | 45 |
| 40 | ----- | 30 |
| 50 | ----- | 27 |
| 60 | ----- | 24 |
| 70 | ----- | 21 |
| 80 | ----- | 18 |
| 90 | ----- | 15 |
| 100 | ----- | 12 |
| 130 | ----- | 10 |
| 150 | ----- | 9 |
| 180 | ----- | 8 |
| 200 | ----- | 6 |
| 250 | ----- | 5,5 |
| 275 | ----- | 5 |
| 300 | ----- | 4 |
| 350 | ----- | 3,5 |
| 400 | ----- | 3 |
| 500 | ----- | 2,5 |
| 600 | ----- | 2 |
| 800 | 10/100 | 18 |
| 900 | 10/100 | 15 |
| 1000 | 10/100 | 12 |
| 1100 | 10/100 | 11,5 |
| 1200 | 10/100 | 10,5 |
| 1300 | 10/100 | 10 |
| 1400 | 10/100 | 9,5 |
| 1500 | 10/100 | 9 |
| 1800 | 10/100 | 8 |
| 1900 | 10/100 | 7 |
| 2000 | 10/100 | 6 |
| 2500 | 10/100 | 5,5 |
| 3000 | 10/100 | 4 |
| 3500 | 10/100 | 3,5 |
| 4000 | 10/100 | 3 |
| 5000 | 10/100 | 2,5 |
| 6000 | 10/100 | 2 |

2009UY

Determinación de Demanda Química de Oxígeno en efluentes domésticos e industriales líquidos, aguas contaminadas y naturales.



Método espectrofotométrico, reflujo cerrado.

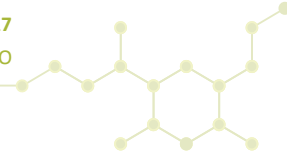
Elaborado - F. Lauber

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda química de oxígeno en efluentes domésticos e industriales líquidos, aguas contaminadas y naturales en el rango entre 29 mg O₂/L y 1000 mg O₂/L. El límite de detección es de 9,7 mg O₂/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del digestor (INE 48)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 94)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 38)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 07)
- 2.9. Registro de preparación de soluciones control (RPS 01)
- 2.10. Registro de preparación de reactivos y estándares (RPR 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico específico fuerte, en condiciones específicas de temperatura y tiempo. La cantidad de oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia de oxígeno.
- 3.2. Los componentes tanto orgánicos como inorgánicos de la muestra son pasibles de oxidación, pero en la mayoría de los casos predominan los componentes orgánicos y son de mayor interés.
- 3.3. La demanda química de oxígeno es un ensayo definido, el alcance en cuanto a la oxidación de la muestra puede ser afectada por el tiempo de digestión, la fuerza del reactivo y la concentración de DQO que posee la muestra.
- 3.4. La muestra se oxida con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y en presencia de catalizadores a 150 °C ± 2 °C, en un sistema cerrado. En el caso de la determinación de DQO a concentraciones mayores a 100 mg O₂/L, el cromato resultante de la reducción del dicromato es determinado espectrofotométricamente a 600 nm. Para concentraciones menores a 100 mg O₂/L, se determina espectrofotométricamente la disminución del dicromato inicial a 420 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. Trabajar en campana de extracción de vapores.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.4. Tener especial cuidado con la solución de dicromato de potasio; dicha solución contiene además del dicromato que es tóxico, una sal de mercurio que es extremadamente tóxica por contacto con la piel y los ojos. La solución de ácido sulfúrico también puede causar quemaduras por contacto con los ojos y la piel.
- 4.5. Disposición final de residuos: se procede de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad, procedimiento PR 15, “Disposición Final de Residuos Generados”.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es de entre el 95 y 100 % del valor teórico. La piridina y compuestos relacionados resisten la oxidación y los compuestos orgánicos volátiles reaccionarán en proporción a su contacto con el oxidante. Los compuestos de cadena alifática lineal son oxidados más efectivamente en presencia de un catalizador de sulfato de plata.

- 5.2. La interferencia más común es el ion cloruro. El cloruro reacciona con el ion plata para precipitar cloruro de plata, y esto inhibe la acción catalítica de la plata. Bromuro, yoduro y cualquier otro reactivo que inactive el ion plata puede interferir de forma similar.
- 5.3. Los iones inorgánicos reducidos tales como: hierro ferroso, sulfuro, magnesio, manganeso, etc. son oxidados cuantitativamente bajo las condiciones de análisis. Para muestras conteniendo niveles significativos de estos iones, suponiendo que se oxidan estequiométricamente, y conociendo su concentración inicial se obtiene el valor de la DQO por medio de correcciones.
- 5.4. Los compuestos alifáticos volátiles de cadena larga no son oxidados, porque al volatilizarse no toman contacto con la solución oxidante.
- 5.5. El presente procedimiento no es apto para analizar muestras que contengan cloruro en concentración superior a 2000 mg Cl/L, debido a la precipitación de cloruros que ocurre con los iones plata y mercurio contenidos en las soluciones de digestión y de ácido sulfúrico.
- 5.6. Si la muestra es preservada con ácido sulfúrico concentrado y es utilizada para relacionarla con DBO o TOC, verificar que todas las determinaciones sean realizadas en las mismas condiciones.

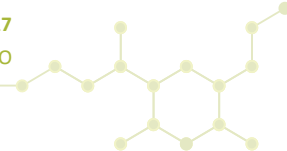
6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual procedimiento 16 (PR 16) "Limpieza de materiales", perteneciente al Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental de DINAMA.
- 6.2. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), un volumen mínimo de 100 mL sin cámara de aire. Refrigerar a temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analizar dentro de las 24 h de extraída la muestra. En caso de necesitar preservar la muestra, llevar a $\text{pH} < 2$ con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y refrigerar a temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$); teniendo en este caso 7 días para analizar la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm (para rango de DQO alto) y 420 nm (para rango de DQO bajo). Adaptador para celdas de sección circular de 25 mm de diámetro (marca Spectronic modelo 21D o similar)
- 7.2. Digestor: block de aluminio con huecos de 85 mm de profundidad y 27 mm de diámetro circular, para alojar tubos de 25 mm de diámetro, que opere a $150\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Nota: los tubos deben poder ingresar y ser extraídos de los huecos fácilmente)
- 7.3. Tubos de digestión: tubos de borosilicato con tapa de rosca resistente al calor y contratapa de teflón, de 50 mL de capacidad y 25 mm de diámetro externo. Asegurar que los tubos utilizados como celdas de lectura posean buena calidad óptica
- 7.4. Matraces aforados de 1000 mL
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (1-10 mL) y punteros correspondientes
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 μL) y punteros correspondientes
- 7.7. Vasos de Bohemia o Erlenmeyers
- 7.8. Dispensadores de volumen variable (1-10 mL)
- 7.9. Balanza de resolución 0,01 g (AND HF 2000G o similar)
- 7.10. Balanza de resolución 0,0001 g (Precisa 205 o similar)
- 7.11. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.12. Equipo para filtración (para el caso de realizar análisis de DQO filtrada)

Nota 1: los materiales para las determinaciones de DQO en el rango de bajas concentraciones (tubos, tapas y tips de pipeta) deben ser utilizados exclusivamente para este fin, dado el alto riesgo de contaminación de los mismos al ser utilizados con muestras con valores de DQO elevados.



8. REACTIVOS

- 8.1. **Solución de digestión para curva de altas concentraciones:** Agregar a 500 mL de agua desionizada 10,216 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ Nro. CAS 7778-50-9) previamente secado a 150 °C por 2 horas, 167 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 cc Nro. CAS 7664-93-9) y 33,3 g de sulfato mercuríco ($HgSO_4$ Nro. CAS 7783-35-9). Disolver, enfriar a temperatura ambiente y diluir a 1000 mL. Almacenar en campana. Vida útil de la solución 4 meses.
- 8.2. **Solución de digestión para curvas de bajas concentraciones:** preparar de la misma forma que la solución para curva de altas concentraciones pero agregando 1,022 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).
- 8.3. **Solución de ácido sulfúrico:** Agregar sulfato de plata (Ag_2SO_4 Nro. CAS 10294-26-5) a ácido sulfúrico concentrado en una relación de 5,5 g/kg de H_2SO_4 (si la densidad del H_2SO_4 concentrado es 1,84 g/mL entonces la adición de Ag_2SO_4 es de 25,3 g en 2,5 L de H_2SO_4). Agitar por inversión esporádicamente. Esperar 1 o 2 días antes de usar esta solución para permitir la disolución completa del Ag_2SO_4 .
- 8.4. **Solución estándar de ftalato ácido de potasio, 1000 mg O_2/L :** Secar ftalato ácido de potasio (KHP Nro. CAS 877-24-7) a 110 °C hasta peso constante. Disolver 850,0 mg en agua desionizada y diluir a 1000 mL en matraz aforado. Conservar la solución refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C). Esta solución es estable por cuatro meses. En caso de observar alteración de la solución, descartar.
- 8.5. **Solución estándar de ftalato ácido de potasio (KHP), 200 mg O_2/L :** Diluir con material aforado 5 veces la solución estándar de 1000 mg O_2/L . Emplear agua desionizada. Esta solución es estable por tres meses. En caso de observar alteración de la solución, descartar.
- 8.6. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.7. **Solución control:** Ver preparación en el Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. La muestra a analizar debe estar homogeneizada, por lo tanto agitar antes de realizar la toma.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. **Curva de calibración:** Realizar una curva de calibración de por lo menos 4 diluciones del estándar.
Para curva de altas concentraciones: Colocar en tubos de digestión: 0,5; 1,0; 2,5; 3,5 y 5,0 mL de la solución estándar de KHP de concentración aproximada 1000 mg O_2/L y completar a un volumen final de 5 mL con agua desionizada. Estas soluciones corresponden a 100, 200, 500, 700 y 1000 mg O_2/L respectivamente. Hacer un blanco de reactivos, con 5 mL de agua desionizada.
Para curva de bajas concentraciones: Colocar en tubos de digestión: 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 y 2,4 mL de la solución estándar de KHP de concentración aproximada 200 mg O_2/L y completar un volumen final de 5 mL con agua desionizada. Estas soluciones corresponden a 32, 48, 64, 80 y 96 mg O_2/L respectivamente. Hacer un blanco de reactivos con 5 mL de agua desionizada en un tubo de digestión.
Blancos: Utilizar un blanco si digerir como solución de referencia; y compararlo con el blanco digerido para confirmar la reacción analítica correcta y para determinar el blanco del método (aceptando un 10 % de apartamiento).
- 10.2. Agregar, trabajando en campana de extracción de gases, a cada tubo de digestión 3,0 mL de solución de digestión correspondiente (según se trabaje con altas o bajas concentraciones) y 7,0 mL de solución de ácido sulfúrico.
- 10.3. Tapar bien los tubos de digestión y agitarlos vigorosamente en forma circular, manteniéndolos en posición vertical.
- 10.4. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C durante 2 horas.
- 10.5. Enfriar los tubos a temperatura ambiente. Para acelerar el proceso de enfriamiento pueden ser colocados en una gradilla dentro de un baño de agua. Secar los tubos con papel absorbente. La gradilla debe ser adecuada para no deteriorar la calidad del vidrio de los tubos, ya que se usan como celda en el espectrofotómetro. Para curva de altas concentraciones realizar el ajuste de cero del equipo a 600 nm con un tubo conteniendo agua desionizada en el portacelda. Para la curva de bajas concentraciones realizar el mismo procedimiento pero a 420 nm.

- 10.6. Para curva de altas concentraciones: Leer la absorbancia a 600 nm. Para esto, ir girando el tubo y leyendo las absorbancias indicadas en el display del equipo. Registrar el menor valor leído.
- 10.7. Graficar la absorbancia leída en función de la concentración del estándar mg O₂/L.
- 10.8. Para la curva de bajas concentraciones: Leer la absorbancia a 420 nm de igual forma que para 600 nm
- 10.9. Graficar “(absorbancia del blanco digerido – absorbancia de estándar)” en función de la concentración del estándar.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Homogeneizar la muestra. Tomar 5,0 mL de muestra o una alícuota adecuada tal que la concentración de DQO este en el rango lineal, en un tubo de digestión y completar con agua desionizada a 5 mL de volumen final. Si la toma debe ser menor a 2 mL realizar una dilución previa de la muestra y luego tomar 5,0 mL de esta dilución. La digestión de la muestra debe hacerse por duplicado.

Nota 3: Estimar la dilución para la digestión, en base a resultados de análisis anteriores de la muestra. En caso de no contar con antecedentes para matrices de efluentes industriales, trabajar con curva de altas concentraciones en primera instancia, si el resultado del análisis es menor a 100 mg O₂/L, realizar la determinación de la muestra con curva de bajas concentraciones. Para el caso de muestras de aguas naturales y no contaminadas, trabajar con curva de bajas.

- 11.2. Agregar a cada tubo de digestión 3,0 mL de solución de digestión y 7,0 mL de solución de ácido sulfúrico. Tapar bien los tubos de digestión y agitarlos vigorosamente en forma circular, manteniéndolos en posición vertical. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C durante 2 horas.

Nota 4: las muestras, la curva de calibración y la Solución control deben ser digeridas simultáneamente en el mismo equipo.

En caso de tener que diluir la muestra se debe realizar una dilución para cada tubo de digestión (independientemente que se considere la misma concentración final de la dilución a realizar o dos concentraciones finales diferentes).

- 11.3. Si el análisis debiera ser repetido fuera de las 24 h, conservar una alícuota de la muestra en un tubo sin cámara de aire almacenada a pH < 2.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. La curva de calibración para altas concentraciones está representada por la siguiente curva lineal:

$$\text{Abs estándar} = a \times (\text{mg O}_2/\text{L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la curva de calibración, respectivamente.

La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

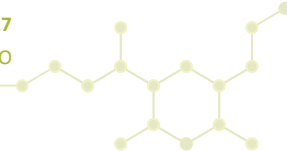
$$\text{DQO (mgO}_2/\text{L)} = \frac{(\text{Absmuestra} - b) \times \text{FD} \times 5}{a \times T}$$

donde:

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

T: corresponde a mL de muestra tomada para el ensayo

Los resultados se expresan en mg O₂/L.



12.2. La curva de calibración para bajas concentraciones está representada por la siguiente curva lineal:

$$\text{Abs bco} - \text{Abs estándar} = a \times (\text{mg O}_2/\text{L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la curva de calibración.

La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{DQO (mgO}_2/\text{L)} = \frac{(\text{Abs bco} - \text{Absmuestra} - b)}{a}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Tomar 2,5 mL de solución de control para la curva comprendida entre 0 y 900 mg O₂/L. Se manipula la solución control y se analiza cómo se describe en el punto 11 'Análisis de la muestra'. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites aceptados, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis. Para el análisis en curva de bajas concentraciones (0 a 100 mg O₂/L), Se emplea una solución control diluida 10 veces. Con cada serie de digestión realizar un control de exactitud.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de una de cada tres muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control correspondientes.

13.3. **Porcentaje de recuperación:**

Fortificación: El porcentaje de recuperación de la adición de una alícuota de solución estándar se realiza en todas las muestras de efluentes industriales que se analicen.

Muestras sin dilución (DQO < 1000 mg O₂/L); se agrega como máximo 4,0 mL de muestra + 1mL de estándar de concentración 1000 mg/L (preparada al igual que la del estándar pero de preferencia a partir de otro lote de reactivos). La toma a realizar para la medición de muestra fortificada debe ser la misma que corresponde al análisis de muestra sin fortificar.

Muestras con dilución (DQO > 1000 mg O₂/L); se agregan 4,0 mL de la dilución de la muestra + 1 mL de estándar de concentración aproximada a 1000 mg/L.

Este control se realiza para tener registro de posibles interferencias y homogeneidad de las matrices.

La fortificación debe estar dentro del rango de control 80 – 120 %, de lo contrario se debe repetir el análisis de la muestra con mayor dilución. Registrar en el histórico de fortificaciones.

Nota 5: para aguas naturales no se realizan fortificaciones al momento de la edición del presente documento.

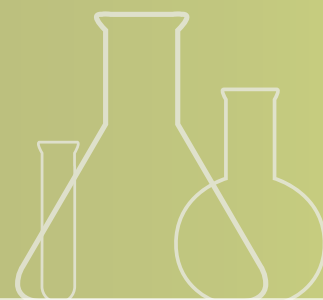
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Métodos 5220 A Chemical oxygen demand (COD) Introduction y 5220 D Closed reflux, colorimetric method pp. 5-16 a 5-17 y 5-20 a 5-21.



2010UY

Determinación de detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno en efluentes líquidos industriales y domésticos.



Método espectrofotométrico

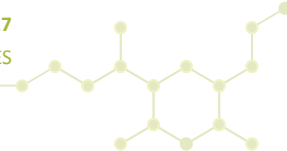
Elaborado - P. Simone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinar detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno en aguas naturales o tratadas y en aguas residuales domésticas e industriales; en un rango de concentración de 0,023 mg/L a 100 mg/L de LAS de peso molecular 318 g/mol. El límite de detección es de 0,0045 mg LAS/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de resolución 0,0001 g (INE 15)
- 2.6. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 05)
- 2.8. Ruta de análisis para preparación de curva (RFQ 30)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno se combinan con este pigmento catiónico, formando un complejo inmiscible en agua, el cual se extrae de la fase acuosa con cloroformo.
- 3.2. Este método es relativamente simple y preciso. Comprende tres extracciones sucesivas en cloroformo, seguido de un lavado y la medición de la intensidad del color azul del compuesto formado en un espectrofotómetro a 652 nm de longitud de onda. Se cuantifica a través de una curva de calibración.
- 3.3. El sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS – linear alkylbenzene sulfonate) es el surfactante aniónico más ampliamente usado y se emplea para estandarizar el presente método; no es un compuesto simple, sino que comprende muchos isómeros y homólogos con estructura $(R'C_6H_4SO_3)Na^+$, donde R' es un grupo alquilo lineal secundario que posee entre 10 y 14 átomos de carbono de longitud. Los surfactantes de tipo sulfato y sulfonato responden ambos a esta metodología.
- 3.4. Los surfactantes aniónicos comúnmente empleados en la formulación de detergentes responden fuertemente al azul de metileno y estos incluyen surfactantes del sulfonato $(RSO_3)Na^+$; del sulfato éster $(ROSO_3)Na^+$; y surfactantes no iónicos sulfatados $(REnOSO_3)Na^+$.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes, lentes de seguridad y máscara de protección de vapores orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).
- 4.2. Trabajar en campana de extracción de gases y manipular con precaución el cloroformo, dado que es tóxico, y carcinogénico por inhalación y contacto a través de la piel.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interferencias positivas resultan de todas otras sustancias sensibles al azul de metileno. Sustancias como los sulfonatos, sulfatos, carboxilatos, fenoles, tiocianatos inorgánicos, cianatos, nitratos y cloruros pueden transferir más o menos de azul de metileno a la fase de cloroformo. Las interferencias por cloruros se eliminan casi completamente y las de nitratos en gran medida, con el agua de lavado en la etapa de extracción.
- 5.2. Los detergentes catiónicos u otros componentes catiónicos como las aminas interfieren negativamente porque compiten por el azul de metileno en la formación de pares iónicos, con los detergentes aniónicos.
- 5.3. El material particulado interfieren negativamente porque algunos MBAS quedan adsorbidos en la superficie. Algunos MBAS se pueden desorber en las posteriores extracciones con $CHCl_3$, pero la recuperación será variable e incompleta.
- 5.4. Los sulfuros que suelen encontrarse en aguas residuales sin tratar o con sólo un tratamiento primario, pueden reaccionar con el azul de metileno formando un compuesto incoloro. Estas interferencias se eliminan agregando al inicio de la técnica peróxido de hidrógeno.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en recipiente de plástico (polietileno o equivalente) o en recipiente de vidrio. Lavado sin detergente. El volumen típico de la muestra es de 1000 mL. Mantenerla refrigerada a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante un período máximo de 48 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro para uso a 652 nm
 7.2. Embudos de decantación de 1000 mL y 250 mL, preferentemente con tapón y válvula de teflón.
 7.3. Balanza de resolución 0,0001 g
 7.4. Matraces aforados de 50,00 mL y 100,00 mL
 7.5. Erlenmeyer de 1000 mL
 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable rango 1 - 10 mL

8. REACTIVOS

- 8.1. Solución stock de LAS 1000 mg/L: pesar una cantidad de estándar de LAS de 1,00 g, en base activa. Disolver en agua, y diluir a 1000 mL; 1 mL = 1,00 mg LAS. Almacenar en la heladera, para disminuir la biodegradación. Si es necesario preparar semanalmente.
 8.2. Solución estándar 10 mg/L: diluir 10,00 mL de la solución stock de LAS llevando a 1000 mL con agua desionizada. 1,00 mL = 10 μg LAS. Preparar diariamente.
 8.3. Indicador fenolftaleína solución alcohólica: disolver 0,5 g de fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ Nro. CAS 64-17-5).
 8.4. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N: disolver 40 g de NaOH en 1000 mL de agua desionizada.
 8.5. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 1 N y 6 N: prepararlos a partir del ácido sulfúrico concentrado, diluyendo con agua desionizada 36 y 6 veces respectivamente.
 8.6. Cloroformo (CHCl_3 Nro. CAS 67-66-3).
 8.7. Azul de metileno (AM $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 61-73-4): disolver 100 mg de AM en 100 mL de agua. Transferir 30 mL de esta solución a un matraz de 1000 mL. Agregar 500 mL de agua, 41 mL de H_2SO_4 6 N y 50 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10049-21-5) y mezclar. Diluir a 1000 mL.
 8.8. Solución de lavado: agregar 41 mL de H_2SO_4 6N a 500 mL de agua desionizada en un matraz de 1000 mL de capacidad. Adicionar 50 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, disolver por agitación y diluir con agua desionizada.
 8.9. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 Nro. CAS 7722-84-1) al 30 % v/v.
 8.10. Lana de vidrio: lavarla con CHCl_3 para remover interferencias.
 8.11. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
 8.12. Alcohol isopropílico ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ Nro. CAS 67-63-0).

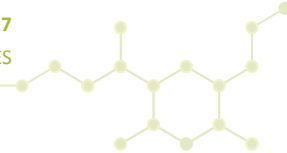
Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aque-llos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Las soluciones stock y estándar necesarias para la realización de la curva de calibración, de la fortificación de la muestra y el chequeo de la curva forman abundante espuma; como el surfactante se concentra en la interfase gas-líquido la solución no tendrá una concentración homogénea. Debe tenerse entonces especial cuidado en evitar la formación de espuma.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar una curva de calibración inicial de por lo menos cinco estándares. El método es lineal en el rango de 10 a 200 μg de MBAS estándar, esto puede variar dependiendo del estándar que se utilice. Siempre que se demuestre la linealidad en el rango de interés, puede variarse el rango de concentración deseado ($r^2=0,995$ o mayor).



Si se cuenta con Material de Referencia Certificado (MRC), la curva puede realizarse con dicho material, asegurando la trazabilidad de la técnica.

10.2. Realizar las diluciones para crear la curva de calibración en cantidades que van desde 0 a 200 µg, considerando un punto cercano al Límite de Cuantificación del método.

Realizando las tomas de solución estándar de LAS o MRC en Erlenmeyers. Adicionar suficiente agua para que el volumen total en cada embudo de decantación sea de 100 mL. Las tomas pueden realizarse en peso, considerando densidad 1 g/L. Trasvasar estas soluciones a los embudos de decantación.

10.3. Realizar el procedimiento de extracción según se detallan en los puntos 11.2 al 11.8.

10.4. Medir la absorbancia a 652 nm; empleando como blanco CHCl₃.

10.5. La curva es válida mientras cumpla con los límites establecidos en el control de calidad descrito en el punto 13.1.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Toma de muestra:

a) Para el análisis directo de agua o efluente, seleccionar el volumen de la muestra según la concentración esperada de MBAS:

| Concentración esperada MBAS mg/L | Volumen de la muestra mL |
|----------------------------------|--------------------------|
| 0,025 – 0,080 | 400 |
| 0,08 – 0,40 | 250 |
| 0,4 – 2,0 | 100 |

b) Si la concentración esperada está por encima de 2 mg/L, tomar una fracción de muestra conteniendo de 40 a 200 µg MBAS y diluir a 100 mL con agua desionizada.

c) Se puede realizar una dilución de 50 veces la muestra original y tomando como mínimo 100 mL, se puede llegar a valores de 100 mg/L de MBAS

11.2. Colocar el volumen de muestra preestablecido en el embudo de decantación de 1000 mL, llevar a medio alcalino con NaOH 1 N hasta viraje de color de la solución a rosado, usando fenolftaleína como indicador. Agregar H₂SO₄ 1 N hasta que desaparezca el color rosado.

11.3. Agregar 10 mL CHCl₃ y 25 mL de azul de metileno. Agitar vigorosamente por 30 segundos y dejar que se separen las fases. Agitación excesiva puede causar formación de emulsión. Si se forma emulsión persistente agregar alcohol isopropílico en una cantidad menor a 10 mL y agregarle el mismo volumen a todos los estándares.

11.4. Tratamiento con peróxido: en caso de ser necesario para evitar la decoloración del azul de metileno por sulfuros; agregar unas pocas gotas de peróxido de hidrógeno al 30 %.

11.5. Antes de separar la capa de CHCl₃, mover suavemente y luego dejar reposar.

11.6. Descargar la capa de CHCl₃ en otro embudo de decantación de 250 mL de capacidad. Repetir la extracción 2 veces más usando 10 mL de CHCl₃ cada vez.

Si el color azul en la fase acuosa desaparece se recomienda; descartar la muestra y usar un volumen menor.

11.7. Juntar todos los extractos de CHCl₃ en el 2º embudo de decantación. Agregar 50 mL de solución de lavado, agitar vigorosamente 30 segundos.

11.8. Mover suavemente y luego dejar reposar. Descargar la capa de CHCl₃ a través de un embudo con un filtro de lana de vidrio a un matraz aforado de 50 mL. El filtrado debe ser límpido.

11.9. Agregar dos tandas de 10 mL de CHCl₃ a la solución de lavado que se encuentra en el embudo de decantación de 250 mL, filtrar y juntarlas con el resto de cloroformo.

11.10. Lavar embudo y lana de vidrio con CHCl₃, que se junta con lo demás. Enrasar a volumen 50 mL.

Nota 2: debido a que el cloroformo es volátil, la suma de todos los volúmenes recogidos no excede los 50 mL.

11.11. Medir la absorbancia a 652 nm; en celdas de 2,5 cm de paso de luz, utilizando como blanco CHCl_3 .

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Graficar la absorbancia leída para cada estándar en función de los μg de LAS tomados para cada punto de la curva según:

$$\mu\text{g LAS}_{\text{estándar}} = T \times C_{\text{LAS}}$$

donde:

T: corresponde a la toma del estándar

C_{LAS} : corresponde a la concentración de la solución estándar LAS de 10 mg/L o MRC

La curva de calibración está representada por la siguiente curva lineal:

$$\text{Abs}_{\text{estándar}} = a \times (\mu\text{g LAS}_{\text{estándar}}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente ordenada en el origen respectivamente

12.2. Los μg de LAS correspondientes a la absorbancia de muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de LAS}_{\text{muestra}} = \frac{(\text{Abs muestra} - b)}{a}$$

12.3. A partir de los μg de LAS, correspondientes a la absorbancia leída de la muestra calcular:

$$\text{mg MBAS/L} = \frac{\mu\text{g de LAS}_{\text{muestra}}}{T_{\text{muestra}}}$$

donde:

T_{muestra} : el volumen de muestra tomado para la extracción en mL

Se debe informar "MBAS, calculada con LAS de peso molecular 318 g/mol

Nota 3: En caso de haber utilizado un estándar o MRC de LAS de peso molecular diferente a 318 g/mol, realizar la corrección correspondiente.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Chequeo de la curva de calibración:** Realizar el chequeo diario de la curva de calibración con soluciones control, una de concentración cercana al Límite de Cuantificación, y la otra de concentración superior a la esperada de las muestras. Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico. El resultado de la solución control de menor concentración se considerara aceptable si se encuentre dentro de un 25 % del valor original, mientras que el valor para la solución control de mayor concentración, no puede apartarse más allá de un 10 % del valor original. Si se superan estos límites preparar una nueva curva de calibración.

13.2. **Precisión:** Las muestras de aguas tratadas, aguas residuales domesticas e industriales se analizaran por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados este dentro de los límites del gráfico de control correspondientes

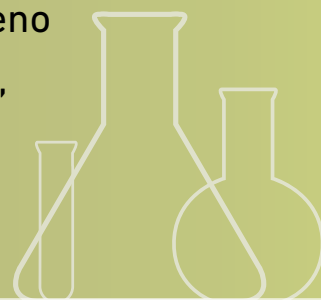
13.3. **Exactitud como porcentaje de recuperación de fortificación:** Las muestras de aguas tratadas, aguas residuales domesticas e industriales se deberán fortificar. Verificar que el porcentaje de recuperación este dentro de los limites de control.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 5540 A Surfactabts Introduction y 5540 C Anionic Surfactants as MBAS, pp 5-50 y 5-53 al 5-55.

2011UY

Determinación de Demanda Química de Oxígeno de bajas concentraciones en aguas naturales, aguas contaminadas y efluentes líquidos.



Método espectrofotométrico, reflujo cerrado

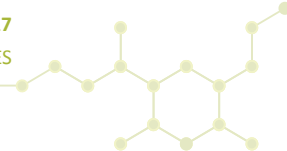
Elaborado - R. Gálvez

Modificado - No aplica

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales. Es posible la utilización del presente procedimiento en efluentes industriales y aguas contaminadas cuyas concentraciones obtenida por el método 2009UY sean menores a 100 mg O₂/L
El límite de detección es 6,4 mg O₂/L, y el límite de cuantificación es 19 mg O₂/L.
El rango de trabajo queda determinado entre 19 y 150 mg O₂/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.5. Instructivo de uso del digestor (INE 105)
- 2.6. Instructivo de uso balanza de resolución 0,001 g (INE 15)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 106)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 38)
- 2.9. Registro de preparación de soluciones control (RPS 01)
- 2.10. Registro de preparación de reactivos y estándares (RPR 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La demanda química de oxígeno (DQO) es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico específico fuerte, en condiciones específicas de temperatura y tiempo. La cantidad de oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia de oxígeno.
- 3.2. Los componentes tanto orgánicos como inorgánicos de la muestra son pasibles de oxidación, pero en la mayoría de los casos predominan los componentes orgánicos y son de mayor interés.
- 3.3. La demanda química de oxígeno es un ensayo definido, el alcance en cuanto a la oxidación de la muestra puede ser afectada por el tiempo de digestión, la fuerza del reactivo y la concentración de DQO que posee la muestra.
- 3.4. La muestra se oxida con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y en presencia de catalizadores a 150 °C ± 2 °C, en un sistema cerrado. En el caso de la determinación de DQO para concentraciones menores a 150 mg O₂/L, se determina espectrofotométricamente la disminución del dicromato inicial a 420 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Si bien las soluciones de dicromato y ácido sulfúrico vienen preparadas y fraccionadas, se debe tener especial cuidado con la solución de dicromato de potasio: dicha solución contiene además del dicromato que es tóxico, una sal de mercurio que es extremadamente tóxica por contacto con la piel y los ojos. La solución de ácido sulfúrico también puede causar quemaduras por contacto con los ojos y la piel.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es de entre el 95 y 100 % del valor teórico. La piridina y compuestos relacionados resisten la oxidación y los compuestos orgánicos volátiles reaccionarán en proporción a su contacto con el oxidante. Los compuestos de cadena alifática lineal son oxidados más efectivamente en presencia de un catalizador de sulfato de plata.
- 5.2. La interferencia más común es el ion cloruro. El cloruro reacciona con el ion plata para precipitar cloruro de plata, y esto inhibe la acción catalítica de la plata. Bromuro, yoduro y cualquier otro reactivo que inactive el ion plata puede interferir de forma similar.

- 5.3. Los iones inorgánicos reducidos tales como: hierro ferroso, sulfuro, magnesio, manganeso, etc. son oxidados cuantitativamente bajo las condiciones de análisis. Para muestras conteniendo niveles significativos de estos iones, suponiendo que se oxidan estequiométricamente, y conociendo su concentración inicial se obtiene el valor de la DQO por medio de correcciones.
- 5.4. Los compuestos alifáticos volátiles de cadena larga no son oxidados, porque al volatilizarse no toman contacto con la solución oxidante.
- 5.5. Si la muestra es preservada con ácido sulfúrico concentrado y es utilizada para relacionarla con DBO o TOC, verificar que todas las determinaciones sean realizadas en las mismas condiciones.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual Procedimiento 16 (PR 16) "Limpieza de materiales", perteneciente al Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental de DINAMA.
- 6.2. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico, un volumen mínimo de 100 mL sin cámara de aire. Refrigerar a temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analizar dentro de las 24 h de extraída la muestra. En caso de necesitar preservar la muestra, llevar a $\text{pH} < 2$ con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y refrigerar a temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$); teniendo en este caso 7 días para analizar la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro con longitud de onda de 420 nm
- 7.2. Digestor: block de aluminio con huecos circular, para alojar tubos de 16 mm de diámetro, que opere a $150\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los tubos deben poder ingresar y ser extraídos de los huecos fácilmente, para evitar que serán rayados.
- 7.3. Tubos de digestión de kit: tubos con los reactivos de borosilicato con tapa de rosca resistente al calor y contratapa de teflón, de 7,5 mL de capacidad y 16 mm de diámetro externo. Asegurar que los tubos utilizados como celdas de lectura posean buena calidad óptica.
- 7.4. Matraces aforados de 1000 mL y 500 mL.
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (1-10 mL) y punteros correspondientes.
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 μL) y punteros correspondientes.
- 7.7. Balanza de resolución 0,01 g (AND HF 2000G o similar).
- 7.8. Balanza de resolución 0,0001 g (Precisa 205 o similar).
- 7.9. Destilador de agua (Barnstead o similar)

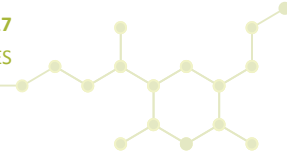
8. REACTIVOS

- 8.1. Solución estándar de ftalato ácido de potasio, 1000 mg O_2/L : secar ftalato ácido de potasio (KHP Nro. CAS 877-24-7) a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Disolver 850,0 mg en agua destilada o grado superior y diluir a 1000 mL en matraz aforado. Conservar la solución refrigerada a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esta solución es estable por una semana. En caso de observar alteración de la solución, descartar.
- 8.2. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente) o grado superior.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. La muestra a analizar debe estar a temperatura ambiente y homogeneizada, por lo tanto agitar antes de realizar la toma.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Curva de calibración:

Realizar una dilución de la solución estándar para obtener una concentración de 150 mg O₂/L aproximadamente.

Realizar una curva de calibración de por lo menos 7 diluciones del estándar, incluyendo un blanco y el límite de cuantificación y que abarque todo el rango de trabajo; completando a un volumen final de 2,5 mL con agua.

10.2. Tapar los tubos y agitarlos en forma circular, manteniéndolos en posición vertical.

10.3. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C durante 2 horas.

10.4. Enfriar los tubos a temperatura ambiente.

10.5. Limpiar los tubos con papel y alcohol antes de medir en el espectrofotómetro. La gradilla debe ser adecuada para no deteriorar la calidad del vidrio de los tubos, ya que se usan como celda en el espectrofotómetro.

10.6. Realizar el ajuste de cero del equipo a 400 nm con un tubo conteniendo agua destilada en el portacelda.

10.7. Leer la absorbancia a 420 nm.

10.8. Graficar la absorbancia leída en función de la concentración del estándar mg O₂/L.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Blancos: utilizar un blanco sin digerir como solución de referencia; y compararlo con el blanco digerido para confirmar la reacción analítica correcta y para determinar el blanco del método (se acepta un 10 % de apartamiento).

11.2. Homogenizar la muestra. Tomar 2,5 mL de muestra y colocarlo en el tubo (kit). Tapar bien el tubo y agitar vigorosamente en forma circular, manteniéndolo en posición vertical

11.3. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C durante 2 horas.

Nota 2: Las muestras, la curva de calibración y la solución control deben ser digeridas simultáneamente en las mismas condiciones.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración para bajas concentraciones está representada por la siguiente curva lineal:

$$\text{Abs estándar} = a \times C + b$$

donde:

a: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

b: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración.

C: corresponde a la concentración en mg O₂/L

12.2. La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{DQO (mg O}_2\text{/L)} = \frac{(\text{Abs muestra} - b)}{a}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Realizar una dilución de la solución control preparada según Manual de Control de Calidad analítico PGCO4, para obtener una solución de 50 mg O₂/L.

Realizar por lo menos un control de exactitud por batch de muestras.

Se acepta un 15 % de apartamiento hasta contar con el grafico de control para la técnica.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras de industrias y de una de cada tres muestras de aguas, y por lo menos un duplicado por batch.

Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor al 15 % hasta contar con grafico de control

13.3. **Porcentaje de recuperación:**

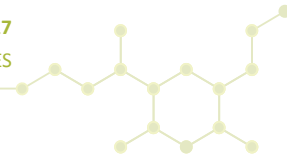
Fortificación: El porcentaje de recuperación de la adición de una alícuota de solución estándar se realiza en

todas las muestras de industrias y en una de cada cinco muestras de aguas que se analicen, siempre como mínimo una fortificación por batch.

La fortificación debe estar dentro del rango de control 80 - 120 %, de lo contrario, evaluar la pertinencia de repetir el análisis. Graficar en un gráfico de control de límites fijos, los valores obtenidos.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard method for examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 5220 A Chemical Oxygen Demand (COD) Introduction y 5220 D Closed Reflux, Colorimetric Method pp. 5-16 a 5-17 y 5-20 a 5-21
- 14.2. Manual del espectrofotómetro: Operation Instructions UV Software UV- 9200/ VIS 7220G, Rayleigh Analytical Instrument Corp.





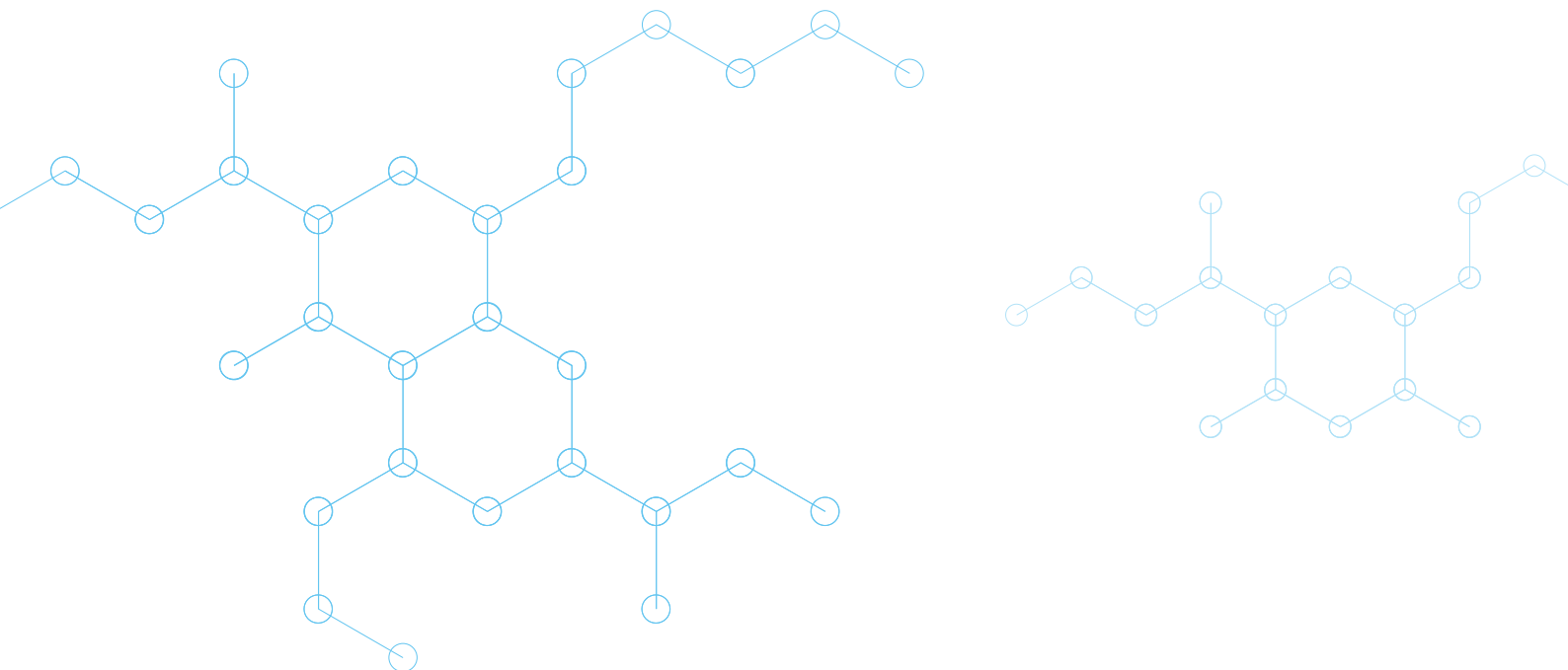
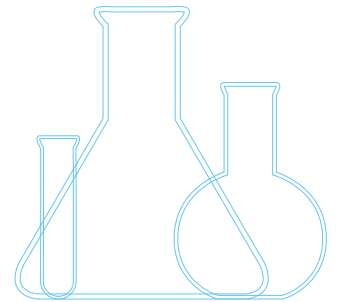
SECCIÓN 3





3.1

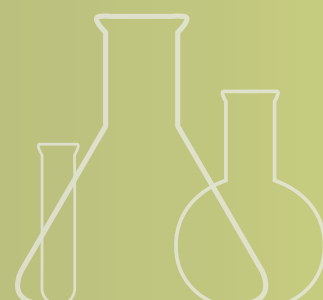
Determinación





3107UY

Determinación de Calcio en aguas naturales
y efluentes industriales.



Método titulométrico con EDTA

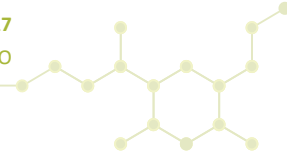
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de calcio en aguas naturales y efluentes industriales. El límite de cuantificación es de 10 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanzas (INE 15, INE 16)
- 2.6. Ruta de análisis (RFQ 08)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La dureza de calcio corresponde a la concentración de calcio expresada como carbonato de calcio, en mg/L.
- 3.2. Los iones calcio y magnesio forman complejos estables con etilendiaminotetra-acetato disódico (EDTA). Si el pH es suficientemente alto (12 a 13) como para que el magnesio precipite como hidróxido, el calcio puede ser determinado directamente. El punto final de la titulación es detectado por el viraje de color del indicador “Murexida”, el cual presenta un color rosado en presencia de calcio y un color púrpura cuando todo el calcio se encuentra formando un complejo con EDTA.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. En muestras conteniendo fósforo en concentraciones mayores a 50 mg/L, no se puede utilizar éste método para la determinación de calcio. El estroncio y el bario presentan interferencia positiva con este método y la alcalinidad en un exceso de 300 mg/L puede causar un punto final erróneo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar 500 mL de la muestra en envase de vidrio o plástico lavado con HNO_3 o bolsa de polietileno hermética descartable para muestras líquidas (dejar cámara de aire de 20 mL).
- 6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 μm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). La muestra es estable durante 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIAL

- 7.1. Matraz Erlenmeyer de más de 100 mL o vaso de Bohemia de igual volumen.
- 7.2. Buretas de 10,0 y 25,0 mL, graduadas en 0,1 mL.
- 7.3. Pipetas automáticas de 1,00 mL y de 10,0 mL.
- 7.4. Matraz aforado de 1000 mL.
- 7.5. Balanza de resolución de 0,01 g.
- 7.6. Balanza de resolución de 0,0001 g.
- 7.7. Agitador magnético.
- 7.8. Barras magnéticas.
- 7.9. Mortero.
- 7.10. Mechero.

8. REACTIVOS

- 8.1. Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N, disolver 4 g en 100 mL de agua destilada.
- 8.2. Indicador murexida (purpurato de amonio $C_8H_8N_6O_6$ Nro. CAS 3051-09-0): mezclar 200 mg de murexida con 100 g de NaCl y pulverizar la mezcla en mortero.
- 8.3. Indicador Negro de Eriocromo-T (NET $C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$ Nro. CAS 1787-61-7): mezclar 500 mg de NET con 100 g de cloruro de sodio (NaCl). Pulverizar en mortero.
- 8.4. Solución buffer: disolver 1,179 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado ($EDTA_{C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O}$ Nro. CAS 6381-92-6) y 780 mg de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Nro. CAS 10034-99-8) o 644 mg de cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ Nro. CAS 10025-77-1) en 50 mL de agua destilada. Agregar ésta solución a 16,9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) y 143 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6) concentrado, mezclando y diluir a 250 mL con agua destilada. Almacenar en botella de plástico, esta solución es estable por un mes.

Nota 1: Se debe descartar la solución buffer, si al adicionar a la muestra 1 o 2 mL de buffer, no se alcanza el pH deseado (pH 10) en la titulación del EDTA.

- 8.5. Solución titulante de EDTA 0,01 M: disolver 3,723 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado (EDTA) en agua destilada y diluir a 1000 mL. Guardar en botella de plástico. Titular contra solución patrón de calcio.

Nota 2: el estándar EDTA titulante (0,01 M), es equivalente a 1000 mg de carbonato de calcio $CaCO_3$ / 1,00 mL. Utilizar esta equivalencia en los cálculos (12).

- 8.6. Solución patrón de calcio 1 g/L $CaCO_3$ (Nro. CAS 471-34-1): pesar 1,000 g de $CaCO_3$ anhidro seco en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Agregar lentamente solución de ácido clorhídrico (HCl) 1+1 hasta que todo el carbonato de calcio se haya disuelto. Agregar 200 mL de agua destilada y hervir por unos minutos para eliminar completamente el dióxido de carbono (CO_2 Nro. CAS 124-38-9). Enfriar, agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar al color intermedio naranja agregando solución 3 N de NH_4OH o HCl 1+1 según corresponda. Transferir cuantitativamente y enrasar a 1000 mL en matraz aforado con agua destilada. 1 mL = 1,00 mg $CaCO_3$.
- 8.7. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

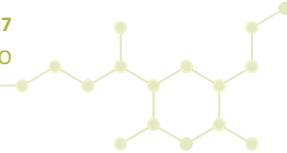
- 9.1. Debido al alto pH requerido en este procedimiento, realizar la titulación inmediatamente después del agregado de la solución álcali (NaOH) y el indicador.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Titulación de la solución de EDTA: tomar 10 mL de la solución patrón de $CaCO_3$ en Erlenmeyer y llevar 50 mL con agua destilada. Agregar 1,0 mL de solución buffer (8.4)

Nota 4: La toma de la solución de $CaCO_3$ debe realizarse con pipeta aforada de 10 mL o en la balanza de precisión 0,01 g.

- 10.2. Agregar una punta de espátula de NET. Titular con la solución EDTA, lentamente y agitando continuamente hasta viraje de color de la solución de rosado a azul.



10.3. La normalidad del EDTA se determina según:

$$N = \frac{C \times T}{G}$$

donde:

N: mg de CaCO_3 equivalentes a 1000 mL de EDTA

C: mg/L CaCO_3 de la solución estándar de carbonato de calcio (8.6)

T: corresponde a la toma en mL de solución de carbonato de calcio

G: corresponde al gasto en mL de EDTA utilizados en la valoración

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Tomar en un Erlenmeyer 50 mL de muestra a analizar o una porción más pequeña diluida a 50 mL. Agregar 1 ó 2 mL de solución de hidróxido de sodio tal que el pH esté entre 12 y 13. Agregar una punta de espátula de reactivo indicador murexida.

Nota 5: la toma de la muestra debe ser tal que el gasto generado éste entre el 20 % y el 90 % del volumen total de la bureta o que el contenido de calcio se encuentra entre 5 – 10 mg. La dilución de la muestra puede llevarse a cabo en peso (empleando la balanza de precisión 0,01 g) o por volumen, en caso de que la toma sea menor a 50 mL debe llevarse el volumen total a 50 mL con agua destilada.

Nota 6: titular inmediatamente después de agregar el buffer y el reactivo indicador, debido a que este último es inestable en condiciones alcalinas.

11.2. Agregar 2,00 mL de NaOH, o el volumen suficiente para producir un pH dentro del rango de 12-13. Mezclar utilizando un agitador magnético.

11.3. Adicionar de 0,1 a 0,2 g de la mezcla del indicador de murexida. Titular agregando la solución de EDTA titulante lentamente y agitando con agitador magnético, hasta viraje de color de la solución de rosado a púrpura. Luego del punto final agregar 1 o dos gotas más de EDTA para verificar que el color no varíe.

11.4. Blanco de reactivos: tomar 50 mL de agua destilada en un Erlenmeyer. Llevar adelante este blanco agregando 2,0 mL de la solución de hidróxido de sodio, 0,2 g de indicador de murexida y adicionar suficiente solución titulante de EDTA hasta producir color estable.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La dureza de calcio se determina según:

$$\text{dureza Calcio, mg CaCO}_3 = \frac{N \times G}{T}$$

$$\text{Calcio, mg/L} = \frac{\text{dureza de Calcio} \times P_{\text{atómico Ca}}}{\text{PM CaCO}_3}$$

donde:

Peso atómico Ca = 40,08

Peso molecular CaCO_3 = 100

N: mg de CaCO_3 equivalentes a 1000 mL de EDTA

T: corresponde a la toma en mL de muestra (se considera densidad de la muestra 1 g/mL)

G: corresponde al gasto en mL de EDTA utilizados en la valoración

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar 10 mL de la solución de “Control de Dureza y Calcio” (elaborada por el Responsable de Calidad o quien indique) simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

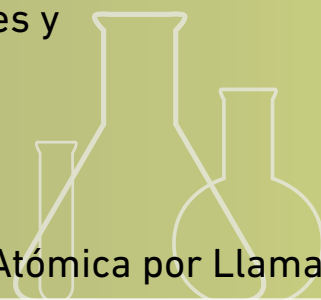
13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado en al menos una de cada tres muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 3500 – Ca A Calcium Introduction y 3500 - Ca B EDTA Titrimetric method pp. 3-67 a 3-69.

3123UY

Determinación de Aluminio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

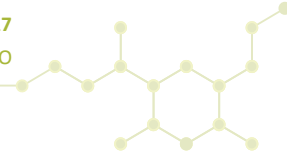
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de aluminio (Al) en aguas naturales, digeridas o no, y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 2,0 mg/L a 70,0 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.11. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 309,3 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 μm . El contenido de aluminio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo. Tener en cuenta que el ácido acético puede generar una mayor recuperación del aluminio presente en la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.
- 5.3. La interferencia causada por ionización del analito en llama se minimiza por agregado de un exceso de una sal de potasio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

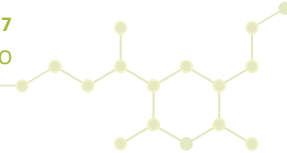
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en bolsa de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 5 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de aluminio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.4. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de aluminio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 39435 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de aluminio metálico de alta pureza en 100 mL de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) calidad para análisis trazas (1 + 1) caliente y diluir a 1 L en matraz aforado. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de aluminio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La



concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de aluminio soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 39435 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de aluminio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.
- 8.10. Oxido nitroso de alta pureza (N₂O Nro. CAS 10024-97-2) calidad mínima 99 %.
- 8.11. Solución de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7): disolver 25 g de KCl calidad PA en 100 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin. Proteger de superficies metálicas hechas en aluminio, como ser estantes de estufas, canastos de secado, bandejas, papel aluminio, etc.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de aluminio, más un cero, por peso utilizando la balanza 7.3, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo ácido nítrico, agua y solución de potasio tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v y 2 % v/v la solución de potasio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Aluminio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de la medida. Es estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra). Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas lípidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de aluminio en el filtrado.

Antes de la determinación agregar 2 mL de solución de cloruro de potasio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir; en éste último caso solo de ser necesario, pesando lo que descarga una pipeta calibrada (pesando con balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin). Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberán realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de aluminio

Longitud de onda: 309,3 nm Ancho de rendija: 0,7 nm

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

11.6. Conectar el Combustible: acetileno

Conectar el Oxidante: óxido nitroso

Tipo de llama: (flujo de acetileno 6,6 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min)

Altura del quemador: 11 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

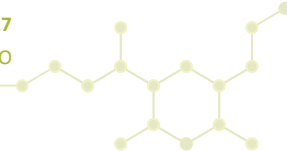
11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración, dentro del rango lineal como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 y potasio, tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 2 % v/v en potasio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.



11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de aluminio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Al/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de aluminio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma en g del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total en g del estándar utilizado, más el ácido nítrico, potasio y agua.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = mx + b$$

12.3. Se determina la concentración de aluminio en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2.)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: los coeficientes de la curva

A: la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de aluminio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Aluminio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

$FD_{1,2}$: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras lípidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{\text{dig}}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f}{(PM/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cloruro de potasio y agua si corresponde).

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 7: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Aluminio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de aluminio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{AlMAD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{AlM} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

C_{AlMAD} : Concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

C_{AlM} : Concentración de Al, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

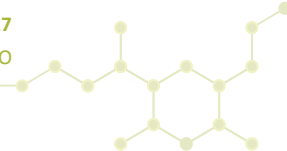
T_{AD} : Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : Concentración de aluminio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 8: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 5 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 u 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.3 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90 - 110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.3 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90 - 110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de aluminio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir en análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rangos normalizados.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de con contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un 10 % para matrices líquidas, y 20 % para matrices sólidas.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

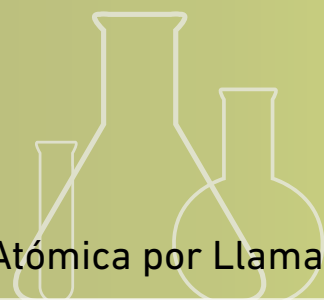
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3127UY

Determinación de Bario en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

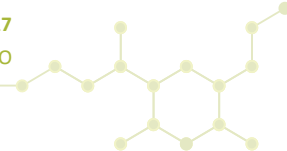
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de bario (Ba) en aguas naturales, digeridas o no, y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.) en el rango de 1,0 a 50 mg/L. Es posible ampliar el rango de medida por concentración, dilución de la muestra. Eventualmente se puede girar el quemador, disminuyendo así la sensibilidad analítica y ampliar así el límite superior de concentración. Para algunas matrices, estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 553,5 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de bario se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agredado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.
- 5.3. La interferencia causada por ionización de los analitos en llama se minimiza por agregado de un gran exceso de una sal de potasio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

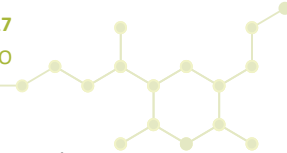
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 5 cm de longitud. (SHIMADZU, AA7000 con autosampler ACS-7000)
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de bario.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 % v/v: solución 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 % v/v: solución 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de bario: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 51994 90092 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,437 g de carbonato de bario (BaCO_3 Nro. CAS 513-77-9) de alta pureza en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) de calidad para análisis de trazas (1 + 1) y diluir a 1 L en matraz aforado con ácido clorhídrico 1 %. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.



- 8.7. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 51994 90092 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de carbonato de bario, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente
- 8.8. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.
- 8.9. Oxido nitroso de alta pureza (N₂O Nro. CAS 10024-97-2), calidad mínima 99 %.
- 8.10. Solución de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7), disolver 25 g de KCl calidad PA en 100 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre que aparece subrayado.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de bario, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo ácido nítrico, agua y solución de potasio tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v y 2 % v/v la solución de potasio. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de bario en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6 ó 8.7., aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

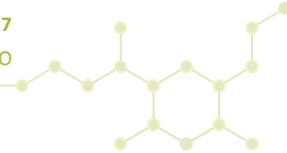
Digestión/ Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de bario en el filtrado.
- 11.2. Previo a la determinación en el espectrofotómetro agregar 2 mL de solución de cloruro de potasio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.
- 11.3. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.4. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.5. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91)
 - 11.6. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 - Lámpara de cátodo hueco de bario
 - Longitud de onda: 553,5 nm ,ancho de rendija: 0,2 nm
 - Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.
 - Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC)
 - 11.7. Conectar el Combustible: acetileno
 - Conectar el Oxidante: óxido nitroso
 - Tipo de llama: de óxido nitroso (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min)
 - Altura del quemador: 11 mm
 - Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos
 - 11.8. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
 - 11.9. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
 - 11.10. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3., con agua 8.2 y ácido nítrico y potasio, tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 2 % v/v en potasio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.
- Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.*
- 11.11. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
 - 11.12. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de bario de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } C \text{ (mg Ba/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de bario, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua, en g.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) de valor conocido en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de bario en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2.).

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: los coeficientes de la curva

A: la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de bario total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Bario total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Ba calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras lípidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{\text{dig}}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_{M'}/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra digerida en g (incluyendo solución de potasio y agua si corresponde).

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$P_{M'}$: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 7: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Bario total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Ba calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco (ver punto 13.5.), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de bario en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación Ba} = 100 \times ((C_{Ba M AD} \times V_{MAD} - C_{Ba M} \times (V_{MAD} - T_{AD})) \times d_{EST} / (T_{AD} \times C_{EST} \times d_{DM}))$$

donde:

$C_{Ba M AD}$: corresponde a la concentración de Ba, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L

$C_{Ba M}$: corresponde a la concentración de Ba, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar

T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

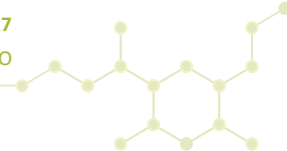
C_{EST} : corresponde a la concentración de bario del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de estándar adicionado más muestra, en g

d_{DM} : corresponde a la densidad de la digestión de la muestra medida en 11.1, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

d_{EST} : corresponde a la densidad del estándar adicionado (8.6 ó 8.7) de valor conocido (g/mL)

Nota 8: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90 -110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de bario obtenido debe estar en el rango 70 -130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70 -130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir en análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

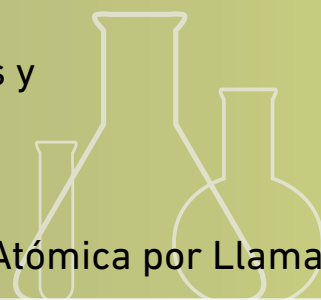
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 D Direct Nitrous Oxide – Acetylene Flame Method 3-21 a 3-22.
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3128UY

Determinación de Cadmio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

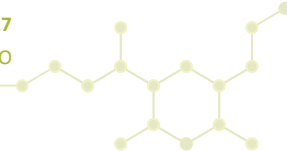
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cadmio (Cd) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,001 a 20 mg/L para aguas naturales y 0,03 a 20 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,0002 mg/L para aguas naturales y de 0,006 para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado,” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 228,8 nm. El contenido de cadmio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

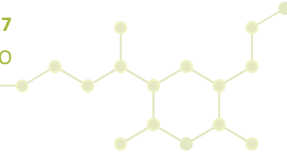
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de cadmio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,00 1 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cadmio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 51994 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de cadmio metálico (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37 % de calidad PA de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cadmio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de cadmio soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).
- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 51994 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la



etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cadmio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2 , Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cadmio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cadmio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20%, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas lípidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cadmio en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 Lámpara de cátodo hueco de cadmio
 Longitud de onda: 228,8 nm, ancho de rendija 0,7nm.
 Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min
 Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno
 Conectar el Oxidante: aire
 Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min)
 Altura del quemador: 7 mm
 Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.
 En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
 De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cadmio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

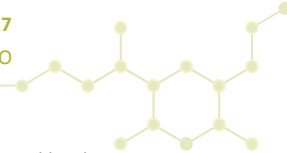
$$\text{Concentración (mg Cd/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de cadmio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

| | |
|---------|---------------|
| Rango 1 | 0,02-0,3 mg/L |
| Rango 2 | 0,3-1 mg/L |

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cadmio en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de cadmio total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cadmio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : Solo si fuera necesario diluir la muestra:

$$FD_2 = \frac{P_f/d_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad_{gr}.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluída, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cadmio total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cadmio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Cd M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Cd M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Cd M AD}$: corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cd M}$: corresponde a la concentración de Cd, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

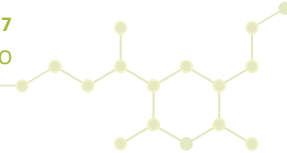
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de cadmio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruída y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente. Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cadmio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

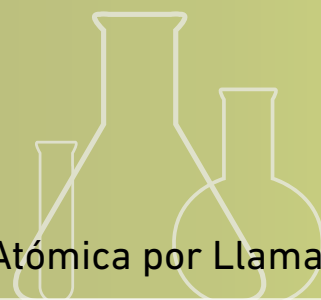
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3129UY

Determinación de Calcio en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

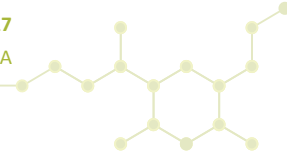
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de calcio (Ca) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,05 a 7 mg/L para la llama de óxido nítrico / acetileno y de 0,4 a 50 mg/L para la llama aire / acetileno. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Cálculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 08, RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc), se determina calcio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. El metal se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 422,7 nm. El contenido de calcio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica, guantes apropiados.
- 4.2. El agredado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.
- 5.3. La presencia de fosfato interfiere en la determinación por formación de complejos de calcio, no atomizables en la llama de aire/acetileno, esta interferencia se elimina por agregado de lantano quien forma un complejo con fosfato de mayor estabilidad liberando así el calcio. Dicha interferencia también puede ser eliminada por el uso de la llama de óxido nitroso/ acetileno teniendo en cuenta que en este caso se debe agregar una sal de cesio para inhibir la ionización del calcio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

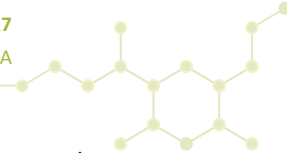
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de calcio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 7.9. Quemador de 5 cm para medida con llama de óxido nitroso / acetileno.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de calcio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 69349 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,2497 g de carbonato de calcio (CaCO_3 Nro. CAS 471-34-1 PA,



secado a 180 °C una hora antes de pesarlo) en agua y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO₃ 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de calcio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO₃ cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de calcio, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.
- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 69349 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de carbonato de calcio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente.
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.
- 8.10. Oxido nitroso alta pureza (N₂O Nro. CAS 10024-97-2), 99 %.
- 8.11. Solución de lantano, disolver 58,65 g de óxido de lantano (La₂O₃ Nro. CAS 1312-81-8 calidad PA) en Erlenmeyer en 250 mL de ácido clorhídrico 37 % (HCl Nro. CAS 7647-01-0 calidad para análisis de trazas metálicas) hasta disolución total, diluir a 1 L con agua desionizada.
- 8.12. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.
- 9.6. Es importante que las muestras, las soluciones de la curva de calibración y de la solución utilizada como control, sean de la misma densidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de calcio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de lantano o 10 % v/v la solución de cesio. (En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico). Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de calcio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

- 10.2. Para verificar el efecto de la matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

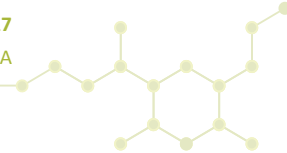
11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / Tratamiento de la muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total, las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas lípidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de calcio en el filtrado.
- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las muestras líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final sea de 10 % v/v para el caso de usar la solución de lantano o 10 % v/v en caso de usar la solución de cesio. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de exactitud.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
- Lámpara de cátodo hueco de calcio
 - Longitud de onda: 422,7 nm. Ancho rendija: 0,7 nm
 - Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.
 - Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno
- Conectar el Oxidante: aire u óxido nitroso
 - Tipo de llama: Aire (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min). Altura quemador de 10 cm: 7 mm
 - Óxido nitroso (flujo de acetileno 6,5 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min). Altura quemador de 5 cm: 11 mm
 - Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante - atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
- De persistir el problema, verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico, otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de calibración
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra en tubo de plástico por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, lantano o cesio, según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % v/v para cesio o 10 % v/v para lantano y misma proporción de ácido nítrico que



las muestras. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de calcio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Ca/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de calcio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o estándares intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua más lantano o cesio.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar medida en 10.1 calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración, graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada y uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de calcio en la digestión de la muestra (CM), o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares.

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de calcio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Calcio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

CM: corresponde a concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco siempre que sea necesario (13.5.) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD1 y FD2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{\text{dig}}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

Mf: corresponde a masa final del digesto en g

ddig: corresponde a densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

dsin dig: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL) muestras acuosas se asume $d = 1 \text{ g/mL}$.

TM: corresponde a toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_{M'} / d_{dig})}$$

donde:

Pf: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio o lantano, según corresponda y agua).

ddig: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

PM: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Calcio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

CM: corresponde a la concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

ddig: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf: corresponde a la masa final del digesto en g

TM: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de calcio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Ca \text{ MAD}} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Ca \text{ M}} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

CCa MAD: corresponde a la concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

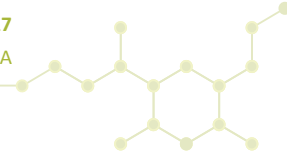
CCa M: corresponde a la concentración de Ca, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

TAD: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

CEST: corresponde a la concentración de calcio del estándar adicionado, en mg/L.

VMAD: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d Dig: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).



Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13 CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de calcio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70 -130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2= 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

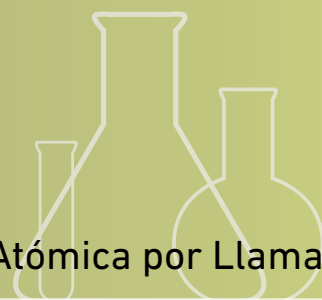
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20 y 3111 D Direct Nitrous Oxide – Acetylene Flame Method pp. 3-21 a 3-22
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3133UY

Determinación de Cinc en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

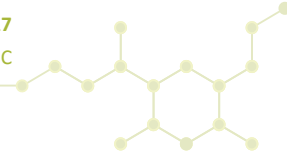
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cinc (Zn) en aguas, aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,003 a 10 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 10 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,001 mg/L para aguas naturales y de 0,05 para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado,” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida, según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 213,9 nm. El contenido de cinc se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2. Utilizar corrección de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

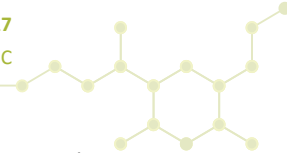
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, con filtro de policarbonato o de ésteres de celulosa, con tamaño de poro de 0,45 μm . Refrigerar a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$). Para muestras sólidas, preservar en heladera hasta el análisis. En ambos casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000 INE91).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de cinc.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 μm .
- 7.8. Filtros de 0,45 μm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1 Agua destilada (grado 3, ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2 Agua desionizada (grado 2, ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3 Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado ($\text{HNO}_{3\text{cc}}$) al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4 Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5 Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.6 Solución estándar de 1000 mg/L de cinc: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 18827 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de cinc metálico (Zn Nro. CAS 7440-66-6) (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz forado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7 Solución estándar de 100 mg/L de cinc: dicha solución se prepara por peso en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de Cinc, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales)



- 8.8 Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 18827 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de cinc, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente.
- 8.9 Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cinc, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cinc en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (volumen agregada debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cinc en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con la balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el instituto Metrológico o un laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 Lámpara de cátodo hueco de cinc
 Longitud de onda: 213,9 nm, ancho de rendija 0,7 mm
 Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14.1, tiempo de estabilización de la lámpara mínimo 10 min.
 Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).
- 11.6. Conectar el combustible: acetileno alta pureza.
 Conectar el oxidante: aire
 Tipo de llama: Aire –Acetileno (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)
 Altura del quemador: 7 mm
 Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.
 En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo de adelante-atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo)
 De persistir el problema ajustar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3, con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde). Alternativamente girar el quemador y volver a empezar con la lectura de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cinc de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

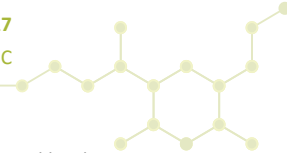
$$\text{Concentración (mg Zn/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de Cinc, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en el rango:

| | |
|---------|---------------|
| Rango 1 | 0,04-0,5 mg/L |
|---------|---------------|

Nota 6: Debido a la relación entre la señal proporcionada por el equipo y la concentración del analito, es posible utilizar una curva de calibración de exponencial de orden dos.

12.3. Se determina la concentración de cinc en la digestión de la muestra (CM), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2).

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de cinc total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cinc total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponden a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f / d_{dig}}{T_M / d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{(P_M / d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 7: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cinc total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, previo al cálculo a partir de la curva de calibración, ver punto 13.5,

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de Cinc en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Zn M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Zn M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Zn M AD}$: corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Zn M}$: corresponde a la Concentración de Zn, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

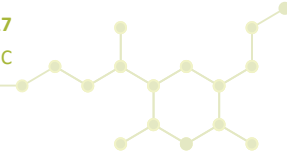
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de Cinc del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 8: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cinc obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. Si existe gráfico de control, los límites quedarán fijados por éste. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

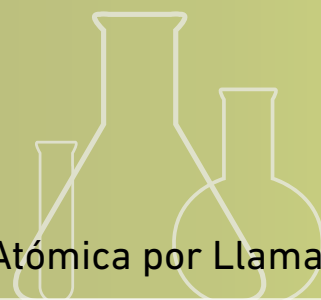
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Métodos 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3134UY

Determinación de Cobre en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

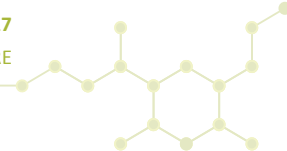
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cobre (Cu) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,004 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,07 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,001 mg/L para aguas naturales y 0,01 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado,” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8, o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 324,8 nm. El contenido de cobre se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácido.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

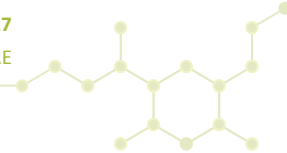
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En ambos casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de cadmio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,00 1 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cobre: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 38996 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de cobre metálico (Cu Nro. CAS 7440-50-8) (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37% de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cobre: dicha solución se prepara por peso en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 CC. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de cobre soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales)
- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 38996 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la



etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cobre metálico o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente

8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cobre, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cobre en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cobre en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada. por Instituto Metrológico Nacional

o laboratorio acreditado para tal fin Registrar en la ruta correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de cobre

Longitud de onda: 324,8 nm, ancho de rendija 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

11.6. Conectar el combustible: acetileno alta pureza

Conectar el oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3, con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente girar el quemador y volver a empezar con la lectura de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

11.10. Leer las muestras de control de calidad de analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cobre de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

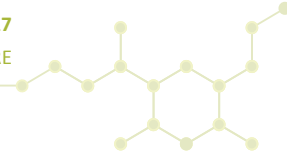
$$\text{Concentración (mg Cu/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de cobre, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

| | |
|---------|---------------|
| Rango 1 | 0,04-0,4 mg/L |
| Rango 2 | 0,4-3 mg/L |

Dependiendo de la absorbancia obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cobre en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de cobre total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cadmio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el Rango 1 0,04-0,4 mg/L Rango 2 0,4-3 mg/L volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{(P_M / d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluída, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cobre total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cobre en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Cu M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Cu M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Cu M AD}$: corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cu M}$: corresponde a la concentración de Cu, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

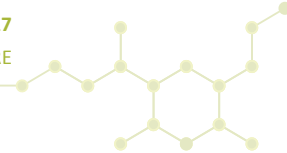
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de cadmio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la sensibilidad del equipo:

Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. Control de veracidad de la determinación: Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. Control de la exactitud del método: Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cobre obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. Adición del estándar: Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. Blancos de digestión: Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. Control de la precisión: Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. Chequeo de curva de calibración: Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

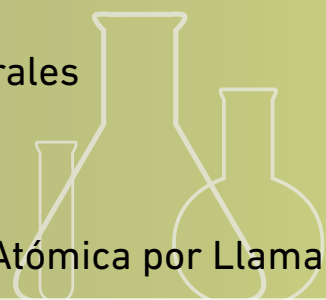
14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3135UY

Determinación de Cromo total en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama.

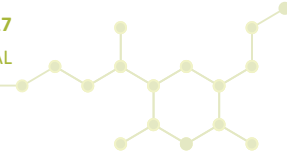
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cromo (Cr) total en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,010- 60 mg/L para aguas naturales y 0,1-60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,0002 mg/L para aguas naturales y de 0,02 para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total soluble y adherido a partículas, la muestra es digerida, según el procedimiento de digestión correspondiente (2.4, 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 357,9 nm. El contenido de cromo se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

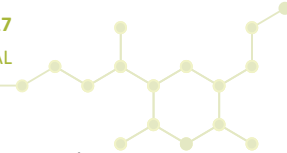
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL).
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de cromo.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g, (INE 06 o INE 07).
- 7.4. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.5. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltra. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$
- 7.7. Filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 7.8. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\ \text{g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cromo: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida FUKA 02733 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: Disolver 1,9230 g de cromo VI (CrO_3 Nro. CAS 1333-82-0, ACS para absorción atómica) en agua 8.2 y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1% v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cromo: dicha solución se prepara por peso, con balanza 7.8, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de cromo, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).



- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Accutrace QCS-03-1 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de óxido de cromo o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2 , Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.1. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de la curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cromo, más un cero, por peso utilizando balanza 7.8, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza tipo 7.8 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Cromo en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el contenido soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (volumen agregada debe ser menor al 5% del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cromo en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.8 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 Lámpara de cátodo hueco de cromo
 Longitud de onda: 357,9 nm, ancho de rendija 0,7 nm.
 Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14.1, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min
 Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno alta pureza
 Conectar el Oxidante: aire
 Tipo de llama: Aire –Acetileno (flujo de acetileno 2,8 L/min, flujo de aire 15 L/min)
 Altura del quemador: 9 mm
 Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.
 En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
 De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cromo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

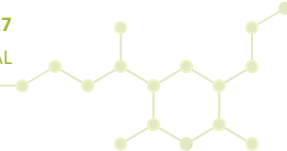
$$\text{Concentración (mg Cr/L)} = C_s \times T_s / M_t \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de cromo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_t : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

| Rangos Linealidad Instrumental para Cr | |
|--|--------------|
| Rango 1 | 0,1-0,5 mg/L |
| Rango 2 | 0,4-3 mg/L |

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cromo en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de cromo total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cromo total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia

del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{(P_M / d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cromo total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cromo en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{CrMAD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{CrM} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

C_{CrMAD} : corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

C_{CrM} : corresponde a la concentración de Cr, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

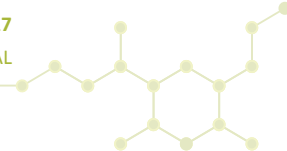
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de cromo del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.8 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.8 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cromo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

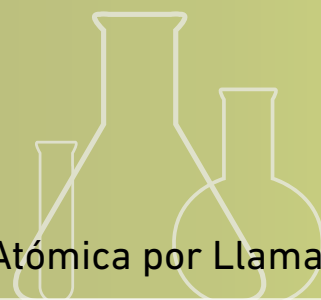
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3138UY

Determinación de Hierro en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

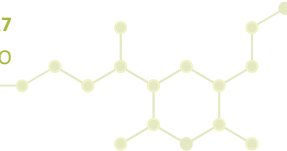
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de hierro (Fe) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,2 a 10 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 248,3 nm. El contenido de hierro se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases y con guantes apropiados.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

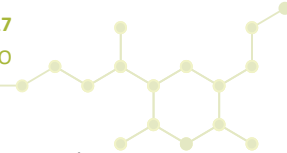
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable (dejar cámara de aire de 20 mL).
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de hierro.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), concentrado al 37 %, $d = 1,2\text{ g/mL}$, Dorwil puro para análisis o similar.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 7.1, preparar anualmente.
- 8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de hierro: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 16596 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de hierro metálico PA (Nro. CAS 7439-89-6) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1% v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.8. Solución estándar de 100 mg/L de hierro: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.7 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de hierro, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.



- 8.9. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.7): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 16596 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar tal como se indica en 8.7 a partir de hierro o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente
- 8.10. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.
- 8.11. Solución de calcio: disolver 630 mg de carbonato de calcio (CaCO₃ Nro. CAS 471-34-1) calidad PA, en 50 mL de ácido clorhídrico 1 + 5, si es necesario, calentar para disolver. Enfriar y diluir a 1000 mL con agua.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar al menos cuatro soluciones estándar de hierro, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, solución de calcio y agua. La concentración final de ácido deberá ser del 20 % v/v, y 25% v/v de la solución de calcio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de hierro en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.7, 8.8 o 8.9, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/ Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro.

Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de hierro en el filtrado.

Previo a la determinación en el espectrofotómetro, agregar 25 mL de solución de calcio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente (RIN 12). Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

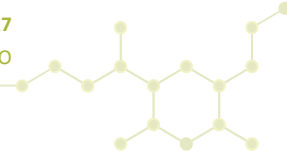
Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 - Lámpara de cátodo hueco de hierro
 - Longitud de onda: 248,3 nm, Ancho de rendija: 0,2 nm
 - Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.
 - Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2)
 - Conectar el Combustible: acetileno
 - Conectar el Oxidante: aire
 - Tipo de llama: (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)
 - Altura del quemador: 9 mm
 - Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso con agua, ácido nítrico, solución de calcio tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 25 % v/v en solución de calcio, en tubo de plástico. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de hierro de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Fe/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de hierro, en mg/L, del estándar utilizado (8.6. 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos)

T_s : corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico, más la solución de calcio, más el agua.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.7, 8.8 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de hierro en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de hierro total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Hierro total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5.) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras límpidas).

12.4.2. Cálculo de FD1:

donde:

M_f : corresponde a las masa final del digesto en g

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_1 = \frac{Mf/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la dilución de la muestra digerida en g (incluyendo solución de calcio).

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 7: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Hierro total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar $C_{M'}$ restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco (ver punto 13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de hierro en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Fe\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Fe\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Fe\ M\ AD}$: Concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Fe\ M}$: Concentración de Fe, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

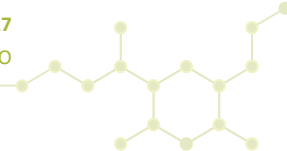
T_{AD} : Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : Concentración de hierro del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : Densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 8: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de hierro obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.

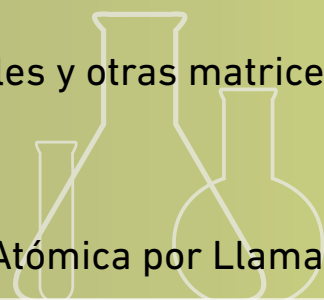
14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.

14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3139UY

Determinación de magnesio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas.



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

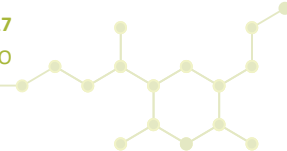
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de magnesio (Mg) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,007 a 1 mg/L, utilizando llama de aire/acetileno u oxido nitroso/acetileno. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 08, RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc), se determina magnesio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 μm . Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. El metal se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 285,2 nm. El contenido de magnesio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.
- 5.3. La presencia de fosfato interfiere en la determinación por formación de complejos de magnesio, no atomizables en la llama de aire / acetileno. Esta interferencia se elimina por agregado de lantano quien forma un complejo con fosfato de mayor estabilidad, liberando así el magnesio. Dicha interferencia también puede ser eliminada por el uso de la llama de óxido nitroso/acetileno teniendo en cuenta que para este caso se debe agregar una sal de cesio para inhibir la ionización del magnesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

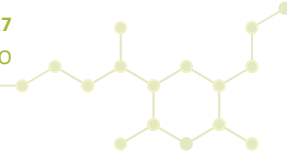
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ ($> 0^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU, AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Quemador de 5 cm para medida con llama de Oxido Nitroso / Acetileno.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 7.9. Lámpara de cátodo hueco de magnesio.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) concentrado al 65 %, $d = 1,40\ \text{g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de magnesio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,1658 g de óxido de magnesio PA (MgO Nro. CAS 1309-48-4) en ácido nítrico y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de magnesio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse



utilizando conjuntamente a la solución de magnesio, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 42992 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de óxido de magnesio, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente.
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂ Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.
- 8.10. Óxido nitroso alta pureza (N₂O Nro. CAS 10024-97-2), 99 %
- 8.11. Solución de lantano, disolver 58,65 g de óxido de lantano (La₂O₃ Nro. CAS 1312-81-8 calidad PA) en Erlenmeyer, en 250 mL de ácido clorhídrico 37 % (HCl Nro. CAS 7647-01-0, calidad para análisis de trazas metálicas) hasta disolución total, diluir a 1 L con agua desionizada.
- 8.12. Solución de cloruro de cesio, disolver 25 g de (CsCl Nro. CAS 7647-17-8 calidad PA) en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o check de calibración.
- 9.6. Es importante que las muestras, las soluciones de la curva de calibración y de la solución utilizada como control, sean de la misma densidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de magnesio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de lantano o 10 % v/v la solución de cesio. En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de calcio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.
- 10.2. Para verificar el efecto de la matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / Tratamiento de la muestra

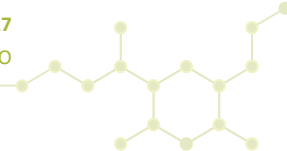
- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de magnesio en el filtrado.
- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, pesando con balanza 7.4. lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final sea de 10 % v/v para el caso de usar la solución de lantano o 10 % v/v en caso de usar la solución de cesio. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
- Lámpara de cátodo hueco de magnesio
 - Longitud de onda: 285,2 nm. Ancho de rendija: 0,7 nm.
 - Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min
 - Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno
- Conectar el Oxidante: aire u óxido nitroso
 - Tipo de llama:
 - de aire (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min) Altura del quemador: 7 mm
 - de óxido nitroso (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de óxido nitroso 11 L/min). Altura del quemador: 11 mm
 - Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
 - Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.
 - En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
 - De persistir el problema, verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de calibración.
- 11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra en tubo de plástico por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, lantano o cesio, según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % v/v para cesio o 10 % v/v para lantano y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de magnesio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Mg/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de magnesio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma en g del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua, más lantano o cesio según corresponda.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de magnesio en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de esta interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de magnesio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Magnesio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{\text{dig}}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio o lantano, según corresponda y agua)

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Magnesio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, (ver punto 13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de magnesio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Mg M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Mg M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Mg M AD}$: corresponde a la concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Mg M}$: corresponde a la concentración de Mg, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

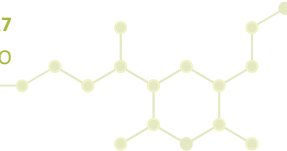
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de magnesio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de magnesio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

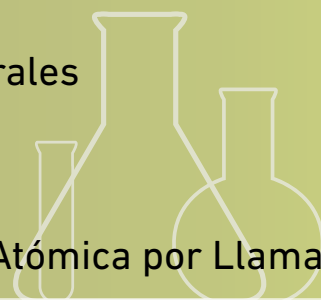
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20 y 3111 D Direct Nitrous Oxide-Acetylene Flame Method 3-21 a 3-22.
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3140UY

Determinación de manganeso en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

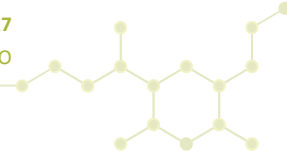
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de manganeso (Mn) en aguas naturales, digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,08 a 7,5 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9) para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 279,5 nm. El contenido de manganeso se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

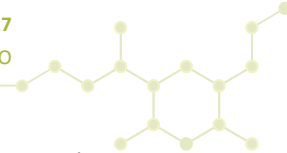
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de manganeso.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio y plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), concentrado al 37 %, $d = 1,2\text{ g/mL}$, Dorwil puro para análisis o similar.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de manganeso: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 77036 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de manganeso metálico PA (Nro. CAS 7439-96-5) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.8. Solución estándar de 100 mg/L de manganeso: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.7 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de manganeso, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.



- 8.9. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.7): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 77036 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de manganeso, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente.
- 8.10. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.
- 8.11. Solución de calcio: disolver 630 mg de carbonato de calcio (CaCO₃ Nro. CAS 471-34-1) calidad PA, en 50 mL de ácido clorhídrico 1 + 5, si es necesario, calentar para disolver. Enfriar y diluir a 1000 mL con agua.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar al menos cuatro soluciones estándar de manganeso, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, solución de calcio y agua. La concentración final de ácido deberá ser del 20 % v/v, y 25 % v/v de la solución de calcio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de manganeso en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, adicionarle uno de los estándares 8.7, 8.8 u 8.9, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5% del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/ Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de manganeso en el filtrado.

Previo a la determinación en el espectrofotómetro, agregar 25 mL de solución de calcio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente (RIN 12). Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de manganeso

Longitud de onda: 279,5 nm Ancho de rendija: 0,2 nm

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

11.6. Conectar el Combustible: acetileno

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante -atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

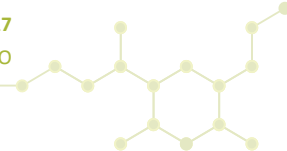
11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, solución de calcio tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 25 % v/v en solución de calcio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de manganeso de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Mn/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de manganeso, en mg/L, del estándar utilizado (8.7, 8.8 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de manganeso en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de manganeso total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Manganeso total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco siempre que sea necesario (13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras lípidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f / d_{\text{dig}}}{T_M / d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD₂:

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de calcio)

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 7: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Manganeso total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD₂: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

ddig: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de manganeso en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Mn M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Mn M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

dónde:

C_{Mn M AD}: corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

C_{Mn M}: corresponde a la concentración de Mn, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

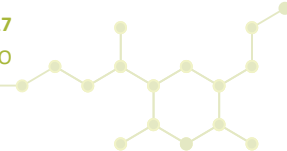
T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de manganeso del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 8: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de manganeso obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 75 - 125 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

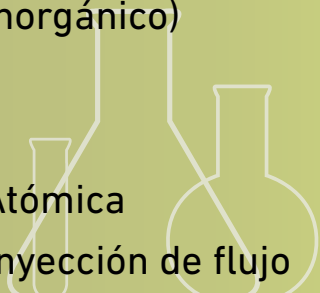
- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3141UY

Determinación de Mercurio total (orgánico e inorgánico)
en matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica
por generación de vapor frío con sistema de inyección de flujo



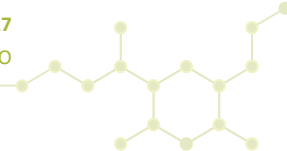
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la determinación de mercurio total (Hg) en matrices ambientales digeridas (aguas naturales incluyendo salobres o salinas, efluentes industriales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.). El rango de trabajo para aguas naturales, efluentes industriales y la solución resultante del test de lixiviación es de 0,20-250 µg/L, siendo el límite de detección de 0,08 µg/L. Para el caso de sedimentos, residuos sólidos y suelos el rango de trabajo queda definido entre 14-17500 µg/kg (para una toma de 0,5 g de muestra), siendo el límite de detección de 3 µg/kg. En algunas matrices en particular, estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de lixiviados (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3238UY)
- 2.7. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia, para la determinación de constituyentes no volátiles.” (3261UY)
- 2.8. Procedimiento: “Cálculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.9. Instructivos de uso de balanza (INE 20)
- 2.10. Instructivo de uso de equipo de digestión por microondas ALTON PAAR (INE 71)
- 2.11. Instructivo para el uso del destilador (INE 109 o 36) e instructivo de uso de desionizador (INE 82 o 28)
- 2.12. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49)
- 2.13. Rutas de análisis (RIN 06, RIN 07B y RIN 20A)
- 2.14. Instructivos de uso para el Sistema de Inyección de Flujo para análisis de Mercurio FIMS100 Perkin Elmer (INE 76).
- 2.15. Instructivo para el procesamiento de datos del programa Win Lab 32 para AA del equipo FIMS-100 (INE 77)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La muestra es tratada según el procedimiento correspondiente (2.5, 2.6 o 2.7). El contenido total de mercurio, se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica por generación de vapor frío, con un sistema de inyección en flujo. El mercurio mono o divalente presente en la muestra es reducido con cloruro estannoso, en medio ácido a Hg⁰. El mercurio elemental producido, es arrastrado por una corriente de gas inerte (Ar) hacia una celda de cuarzo, ubicada en el camino óptico del Espectrofotómetro de Absorción Atómica, donde se determina la absorbancia a una longitud de onda de 253,7 nm. El contenido de mercurio en la muestra se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con lentes de seguridad, guantes resistente a ácidos y túnica.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras se trabaja con el equipo de absorción atómica, y/o la trampa de carbón activado a la salida de la celda de cuarzo.
- 4.5. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos: extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.
- 4.6. Los descartes del equipo (soluciones estándares, muestras, reactivos) son recogido en un recipiente con

permanganato reteniendo por oxidación el Hg^0 que pudiera estar presente.

- 4.7. El bromuro de potasio y el bromato de potasio, son altamente tóxicos. Tener especial precaución a la hora de manipular y disponer soluciones que los contengan. Se recomienda descartarlos en un recipiente separado.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Algunos compuestos orgánicos volátiles pueden absorber en el rango del espectro UV, produciendo errores en la determinación de mercurio. Muestras con alto contenido de cloruros, como aguas de mar o estuarios, y algunos efluentes industriales, pueden liberar cloro gas durante la etapa de digestión. Este, absorbe a la longitud de onda de medida, por lo tanto debe ser eliminado antes de la etapa de reducción con cloruro estannoso (SnCl_2).
- 5.2. La humedad arrastrada junto con el vapor de mercurio hacia la celda de medición, puede condensar sobre la ventana de cuarzo y causar un error en la determinación, para evitarlo, esta debe ser termostatzada (ejemplo con lámpara infrarroja) durante las medidas.
- 5.3. Ioduro en concentraciones mayores a 0,1 mg/L puede causar interferencias por formación de complejos de mercurio, no reducibles por SnCl_2 .
- 5.4. Concentraciones de cobre altas pueden interferir en la determinación. Esta interferencia, en caso de ser posible, se elimina diluyendo los digestos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

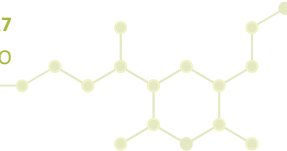
- 6.1. Recolectar la muestra líquidas en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 250 mL con contratapa de PTFE. Para el caso de muestras sólidas utilizar una bolsa de muestreo de plástico descartable. La cantidad mínima de muestra requerida para el análisis, es 200 mL para muestras acuosas y 100 g para muestras sólidas.
- 6.2. Preservar agregando a las muestras acuosas 10 mL de ácido clorhídrico concentrado por litro de muestra, verificar que el pH de las muestras sea menor que 1. Indicar la preservación en la etiqueta. Analizar antes de 28 días. Para las muestras sólidas, refrigerar a temperatura $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) y analizar lo antes posible, previo a los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con celda de cuarzo, generador de vapor frío, y sistema de inyección de flujo (Perkin Elmer FIMS 100).
- 7.2. Balanza de resolución 0,001 g.
- 7.3. Pipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 10000 μL).
- 7.4. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 y 50 mL de capacidad.
- 7.5. Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente. Trazas de $\text{Hg} < 5 \text{ ppb}$.
- 8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, $d = 1,16 \text{ g/mL}$, Mallinckrodt UN1789 o equivalente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico al 50 % para lavado: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua desionizada (8.2). Verificar periódicamente el contenido de mercurio de esta solución.
- 8.6. Solución de cloruro estannoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10025-69-1): pesar 5,5 g de cloruro estannoso para análisis de mercurio, MERCK 596470 o equivalente; agregar 15 mL de ácido clorhídrico concentrado para diluir completamente, y llevar a 500 mL con agua desionizada (8.2). Realizar esta operación en campana de extracción y con precaución, ya que se está agregando agua sobre un ácido fuerte. Preparar previo a la determinación.
- 8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de mercurio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida y trazable a NIST AccuTrace AA34N-1o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta



(1 mL de solución corresponde a 1 mg de Hg).

- 8.8. Solución madre de mercurio (10 mg/L): tomar 0,1 mL de solución madre de 1000 mg/L (8.7), y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2).
- 8.9. Solución madre de mercurio (0,5 mg/L): tomar 0,5 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.8) y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2).
- 8.10. Solución madre de mercurio (0,05 mg/L): tomar 1,0 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.9) y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2).

Nota 1: La vigencia de las soluciones madre de mercurio (8.8, 8.9 y 8.10) es de 24 horas.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

- 8.11. Material de referencia certificado de mercurio total en la matriz correspondiente, que deberá contener mercurio orgánico e inorgánico.
- 8.12. Solución de limpieza de HNO₃ al 2 % para limpieza del sistema de toma de muestra.
- 8.13. Solución carrier: ácido clorhídrico 3 %, preparada a partir de (8.4). Preparar previo a la determinación.
- 8.14. Solución de hidroxilamina (NH₂OH Nro. CAS 5470-11-1): disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina, Fluka 101156509 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por 1 mes.
- 8.15. Solución de permanganato de potasio (KMnO₄ Nro. CAS 7722-64-7): 5 g en permanganato de potasio, Merck 536092 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Preparar previo a la determinación.

Nota 3: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado convencional, deberá enjuagarse por inmersión en solución (8.5), mínimo 12 horas en la tarrina identificada para tal fin. Luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y finalmente secar en estufa a 100 °C. Este material se mantiene identificado, siendo su único uso para determinación de mercurio. Para los recipientes de digestión, se realiza una corrida de blancos, con ácido nítrico (8.3).
- 9.2. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio, principalmente con muestras con bajo contenido de Hg, ya que pueden ser objeto de contaminación ambiental, si son manipuladas en ambientes donde previamente se utilizaron reactivos que contienen mercurio. Preferentemente, trabajar con recipientes cerrados de reactivos y muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Los puntos de calibración son preparados dentro de los recipientes de digestión y son tratados de igual manera que las muestras a analizar.

Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de mercurio y un blanco, a partir de las soluciones estándar (8.8 y 8.9) diluyendo con las mismas proporciones de reactivo de digestión correspondiente a la matriz a determinar. Tomar en cuenta para este paso las referencias (2.4 y 2.5).

Registrar el peso de la toma del estándar y el peso final de la solución en el RIN 07B. Para la preparación de la curva en el caso de matrices líquidas seguir la siguiente tabla:

| Solución madre | Volumen sol. madre (mL) | Volumen Final (mL) | Concentración µg/L |
|----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| 8.10 | 0,05 | 25 | 0,1 |
| 8.10 | 0,25 | 25 | 0,5 |
| 8.9 | 0,075 | 25 | 1,5 |
| 8.9 | 0,25 | 25 | 5 |
| 8.9 | 0,6 | 25 | 12 |

Las concentraciones de la curva de calibración deberán tener en cuenta la concentración esperada de las muestras a analizar. Para el caso de matrices sólidas, los agregados de las soluciones de mercurio, se deben calcular teniendo en cuenta el volumen final de muestra más reactivos de digestión.

10.2. Verificar línea de base con una solución de nítrico al 20 %.

10.3. La sensibilidad del equipo debe ser chequeada antes de realizar las medidas. Para esto se utiliza una solución de 5 µg/L de Hg al 20 % en ácido nítrico. Su absorbancia debe ser de al menos 0,08 unidades de absorbancia.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Tratamiento de la Muestra y Digestión

11.1. Las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos (2.4, 2.5 o 2.6), previo a la medida en el espectrofotómetro.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1,0 mL (IN 407 o equivalente). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (RIN 07B).

Medida

11.3. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Sistema de Inyección de Flujo para Análisis de Mercurio FIMS -100 (INE 76).

11.4. Verificar el funcionamiento del equipo, realizando la determinación de un blanco de agua destilada al 20% en ácido nítrico y una solución estándar de 5 ppb de mercurio, la señal del estándar deberá ser mayor a 0,08 unidades de absorbancia.

11.5. Medir los estándares de la curva de calibración, muestras, duplicados, fortificados y el check de digestión.

11.6. Si la medida de una muestra excede el valor del estándar más concentrado, realizar una dilución por peso de esta muestra, con una solución en las mismas proporciones de reactivos que las utilizadas para la digestión. Todas las soluciones deberán tener la misma densidad. En el caso de ser necesario realizar una fortificación de la dilución, esta deberá hacerse con la solución madre de mercurio (8.8 o 8.9).

11.7. Aproximadamente cada 15 lecturas de muestras, medir un estándar de concentración intermedia y al finalizar todas las medidas, la curva de calibración. Verificar que la absorbancia de los mismos no haya disminuido más del 10 % del valor inicial.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de mercurio de cada solución estándar (8.8, 8.9 y 8.10) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g Hg/L}) = (C_s \times T_s) / M_{\text{sol}} / d_{\text{H}_2\text{O}}$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de mercurio, en µg/L, del estándar de partida

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en mL.

M_{sol} : corresponde a la masa total de la solución (g)

$d_{\text{H}_2\text{O}}$: corresponde a la densidad del agua desionizada (1,0 g/L)

12.2. Calcular la concentración de mercurio en cada punto de la curva de calibración de la siguiente forma:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g Hg/L}) = [(C_s \times T_s) / (M_f / d_{\text{dig}})]$$

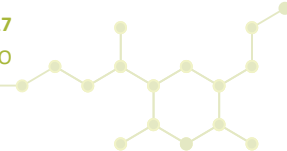
donde:

C_s : corresponde a la concentración de mercurio, en µg/L, del estándar utilizado (8.8, 8.9 y 8.10)

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en mL.

M_f : corresponde a la masa final del estándar digerido (g)

d_{dig} : corresponde a la densidad del estándar digerido (g/mL)



12.3. Se determina la concentración de mercurio en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma, interpolando en la curva de calibración preparada con los estándares, usando un procesador de datos comercial (Excel o equivalente) o con el software del equipo FIMS-100. Al graficar el área de los picos de los estándares (y) en función de la concentración de los mismos (x) se obtiene la siguiente curva:

$$y = mx + b$$

Por lo que:

$$CM = \frac{(y-b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

y: corresponde al área de la señal de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración final de mercurio en la muestra de la siguiente forma:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Mercurio } \mu\text{g/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Hg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda ($\mu\text{g/L}$).

FD_1, FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{\text{dig}}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1 \text{ g/mL}$.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 (para muestras que superan el mayor punto de la curva):

$$FD_2 = \frac{P_f}{P_M}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g, diluyendo con la mezcla de digestión correspondiente

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra necesite ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Mercurio } \mu\text{g/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Hg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en $\mu\text{g/L}$.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto (12.4.3).

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra (antes o después de la digestión según corresponda):

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times (C_{Hg MAD} - C_{Hg M}) / C_{AD}$$

donde:

$C_{Hg MAD}$: corresponde a la concentración de Hg de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en $\mu\text{g/L}$.

$C_{Hg M}$: corresponde a la concentración de Hg, de la muestra sin adicionar en $\mu\text{g/L}$.

C_{AD} : corresponde a la concentración del estándar adicionada a la muestra fortificada en $\mu\text{g/L}$.

Nota 5: Se asume densidad 1 g/mL del estándar utilizado en la fortificación, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia cuya matriz sea similar a las muestras a analizar. El contenido de mercurio obtenido debe estar en el rango 70-130% del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente (8.11).

Muestras fortificadas:

Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según (12.5), debe estar dentro del rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

13.2. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como rangos normalizados o RSD. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un 10 % para matrices líquidas, y 20 % para matrices sólidas.

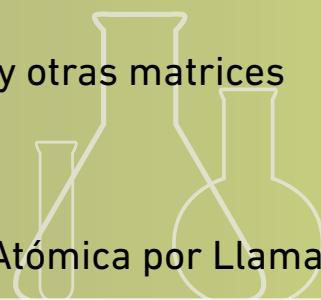
13.3. **Control de blanco:** El control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra. La señal de blanco no debe superar 0,0150 unidades de absorbancia o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. En el caso de no cumplir los criterios de aceptación de blancos se evaluará la repetición del análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury, Setting Up and Performing Analyses. Perkin Elmer.
- 14.2. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury/ Hydride Analyses, Recommended Analytical Conditions and General Information, Perkin Elmer
- 14.3. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury, Hardware Guide, Perkin Elmer.
- 14.4. ISO 5666, Water quality - Determinación of Mercury, First edition 2012-04-15.
- 14.5. EPA, Method 7470A Mercury in liquid waste, September 1994, revision 1.
- 14.6. EPA, Method 245.1 Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, revision 3.0.

3142UY

Determinación de Níquel en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

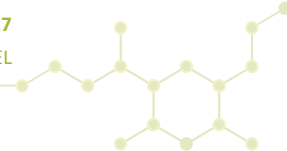
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de Níquel (Ni) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,01 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,002 mg/L para aguas naturales y de 0,03 para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TLCP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 232,0 nm. El contenido de Níquel se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

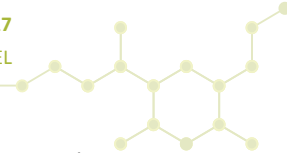
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-700, INE105).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de níquel.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE94).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$.
- 7.8. Filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\ \text{g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de níquel (Ni Nro. CAS 7440-02-0): usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 42242 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de níquel metálico (PA) en el mínimo volumen de ácido nítrico caliente y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de níquel: dicha solución se prepara por peso, en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de níquel soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).



- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 42242 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de níquel, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur[®] 1.09492.0100 o equivalente
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de níquel, más un cero por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Níquel en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de níquel en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 Lámpara de cátodo hueco de níquel
 Longitud de onda: 232,2 nm, ancho de rendija 0,2 nm.
 Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min
 Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno de alta pureza
 Conectar el Oxidante: aire
 Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,6 L/min, flujo de aire 15 L/min)
 Altura del quemador: 7 mm
 Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.
 En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
 De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de níquel de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

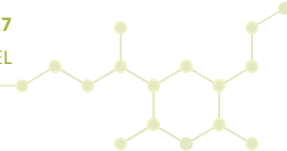
$$\text{Concentración (mg Ni/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de níquel, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

| | |
|---------|--------------|
| Rango 1 | 0,1-0,5 mg/L |
| Rango 2 | 0,5-3 mg/L |

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de níquel en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de níquel total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Níquel total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{(P_M / d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Níquel total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde. el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de níquel en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Ni M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Ni M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Ni M AD}$: corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Ni M}$: corresponde a la concentración de Ni, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

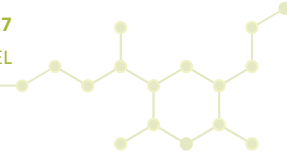
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de níquel del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de níquel obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:**

Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:**

Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

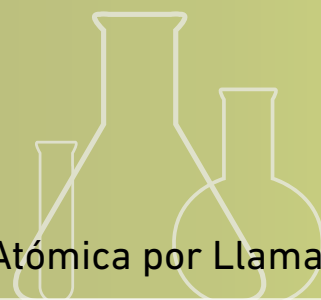
14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3145UY

Determinación de Plata en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

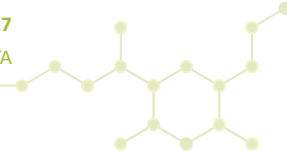
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de plata (Ag) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 1,00 a 10,0 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 328,1 nm. El contenido de plata se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

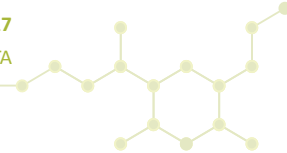
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o esteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de plata.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$.
- 7.8. Filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\ \text{g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución 5 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de plata: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TraceCert[®] 39361 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,1575 g de nitrato de plata PA (AgNO_3 Nro. CAS 7761-88-8) en agua desionizada y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar protegida de la luz. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de plata: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de plata, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales. Almacenar protegida de la luz.
- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TraceCert[®] 39361 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la



etiqueta o en el certificado. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de nitrato de plata, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2 , Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de plata, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de plata en cada uno de ellos según 12.1. Preparar semanalmente.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, adicionarle uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas lípidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de plata en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
 Lámpara de cátodo hueco de plata
 Longitud de onda: 328,1 nm Ancho de rendija: 0,7 nm
 Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.
 Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).
- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno
 Conectar el Oxidante: aire
 Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,2 L/min, flujo de aire 15 L/min).
 Altura del quemador: 7 mm
 Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
 De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3, (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v si corresponde), en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

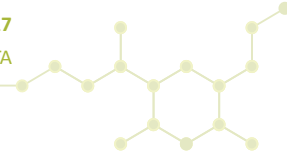
- 12.1. Calcular la concentración de plata de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Ag/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de plata, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.



M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada, en g, y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de plata en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancias proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada en los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de plata total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Plata total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Plata total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de plata en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Ag M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Ag M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Ag M AD}$: corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Ag M}$: corresponde a la concentración de Ag, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de plata del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

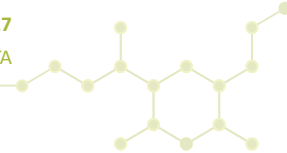
Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la sensibilidad del equipo: Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. Control de veracidad de la determinación: Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de



concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

- 13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plata obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

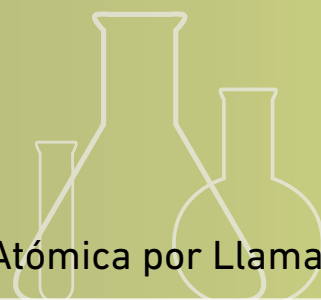
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.



3146UY

Determinación de Plomo en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotetría de Absorción Atómica por Llama

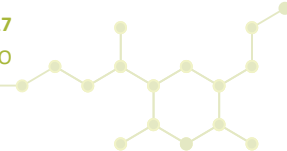
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de plomo (Pb) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,04 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,009 mg/L para aguas naturales y de 0,05 para otras matrices ambientales digeridas

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105)(INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para contenido total, La muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 217,0 nm o a 283,3 nm.. El contenido de plomo se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo. En algunos casos extremos, no usuales en muestras ambientales, elevado contenido de cobre (mayor al 1 %) puede interferir con la línea de 217,0 nm, en este caso usar la línea menos sensible de 283,3 nm.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

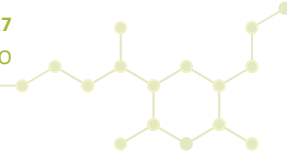
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de plomo.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).
- 7.4. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.5. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.7. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 7.8. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de plomo: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida FLUKA 16595 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,5980 g de nitrato de plomo (ACS para Absorción Atómica) en agua 8.2 y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de plomo: dicha solución se prepara por peso con balanza 7.8, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de plomo soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).
- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración



y densidad conocida, Accutrace QCS -03-1 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de nitrato de plomo o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2 , Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de la curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de plomo, más un cero, por peso utilizando balanza 7.8, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.8 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Plomo en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

Nota 4: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

- 10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (volumen agregada debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de plomo en el filtrado.
- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si

corresponde, pesando con balanza 7.8 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de plomo

Longitud de onda: 217,0 nm, ancho de rendija 1,3 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

- 11.6. Conectar el Combustible: acetileno de alta pureza

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada.. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, preparar estándares como en 10.1 de mayor concentración, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

Nota 5: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de plomo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

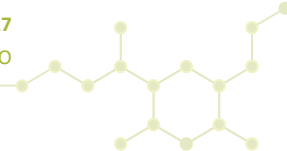
$$\text{Concentración (mg Pb/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de plomo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.



d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

| Rangos linealidad Instrumental para Pb | |
|--|---------------|
| Rango 1 | 0,16-0,5 mg/L |
| Rango 2 | 0,4-3 mg/L |

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de plomo en la digestión de la muestra (CM), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de plomo total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Plomo total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 : Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{(P_M / d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Plomo total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times Mf / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de plomo en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Pb M AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Pb M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Pb M AD}$: corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cd M}$: corresponde a la concentración de Pb, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

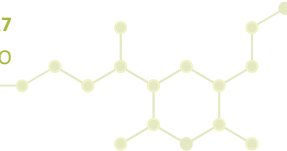
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de plomo del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.8 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.8 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plomo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20.



3147UY

Determinación de Potasio en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

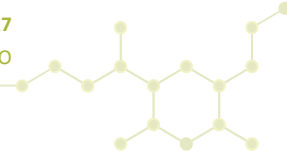
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de potasio (K) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,05 a 2,5 mg/L. El límite de detección es de 0,02 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 08, RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc.), se determina potasio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. En ambos casos se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 766,5 nm. El contenido de potasio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica, guantes.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. Usar siempre la de extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.
- 5.3. La interferencia causada por ionización del analito en la llama se minimiza por agregado de un exceso de una solución de cesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

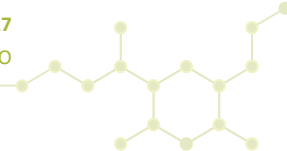
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS -7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de potasio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$
- 7.8. Filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de potasio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 96665 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o el certificado. Alternativamente: disolver 1,9070 g de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7, PA para Absorción Atómica secado a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 hora) en agua desionizada (8.2) y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de potasio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5% v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de potasio, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.



- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert® 96665 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cloruro de potasio.
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.
- 8.10. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las, muestras previo, a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.
- 9.6. Es importante que las muestras, las soluciones de la curva de calibración y de la solución utilizada como control, sean de la misma densidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de potasio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de cesio tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de cesio (en caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico). Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de potasio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.
- 10.2. Para verificar el efecto matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / Tratamiento de la muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de potasio en el filtrado.

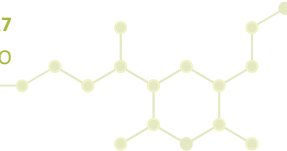
- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las muestras líquidas, previo a digerir, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de cesio tal que la concentración final sea de 10 % v/v. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
Lámpara de cátodo hueco de potasio
Longitud de onda: 766,5 nm Ancho de rendija: 0,7mm.
Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min
Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).
- 11.6. Conectar el combustible: acetileno
Conectar el oxidante: aire
Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min).
Altura del quemador: 7 mm.
Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra en tubo de plástico, por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, cesio y ácido nítrico según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10% para el cesio y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a comenzar con las soluciones de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.10. Medir las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de potasio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } C \text{ (mg K/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración de potasio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma en g, del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico, más el cesio, más el agua.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de potasio en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de potasio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Potasio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f / d_{\text{dig}}}{T_M / d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio y agua)

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad d_f .

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Potasio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de potasio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{K_{MAD}} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{K_M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{K_{MAD}}$: corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

C_{K_M} : corresponde a la concentración de K, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

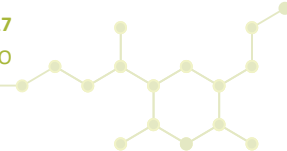
T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de potasio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de potasio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

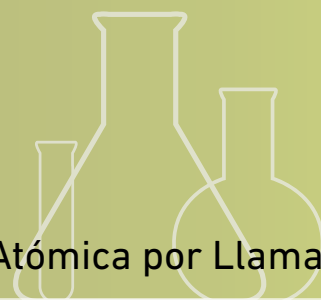
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.
- 14.4. ISO 9964-2 Water quality- Determination of sodium and potassium - part 2: Determination of potassium by atomic absorption spectrometry, 1st edition 1993-05-01.



3149UY

Determinación de Sodio en aguas naturales
y otras matrices ambientales digeridas



Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

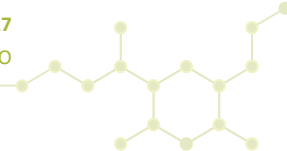
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de sodio (Na) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en los rangos de 0,05 a 1 mg/L y 10 a 50 mg/L según la longitud de onda utilizada (589,0 nm y 330,2 nm respectivamente). Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de suelos y sedimentos para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo.” (3262UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.” (3236UY)
- 2.7. Procedimiento: “Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado.” (3260UY)
- 2.8. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).” (3261UY)
- 2.9. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.” (3237UY)
- 2.10. Procedimiento: “Determinación de la Turbidez en agua.” (1022UY)
- 2.11. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.12. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).
- 2.13. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.14. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.15. Instructivo para el uso del destilador (INE 36, INE 109).
- 2.16. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.17. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).
- 2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)
- 2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc.), se determina sodio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 μm . Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9) para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. En ambos casos se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 589,0 ó 330,2 nm. El contenido de sodio se determina mediante una curva de calibración.

Nota 1: El procedimiento 2.8 no es una digestión, es una extracción del metal en las condiciones del ensayo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

4.4. Usar siempre encendida la extracción de gases mientras esté la llama encendida.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9.
- 5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.
- 5.3. La interferencia causada por la ionización del analito en la llama se minimiza por agregado de un exceso de una sal de cesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

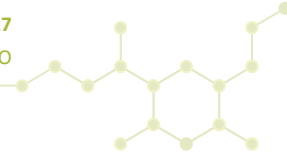
- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos coleccionar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.
- 6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 μm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco de sodio.
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE06 ó INE07).
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
- 7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).
- 7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.
- 7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 μm
- 7.8. Filtros de 0,45 μm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40$ g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de sodio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert[®] 05201 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 2,5420 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS7647-14-5, PA para Absorción Atómica secado a 140 °C 1 hora) en agua desionizada y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.
- 8.7. Solución estándar de 100 mg/L de sodio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse



utilizando conjuntamente a la solución de sodio, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

- 8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert[®] 05201 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cloruro de sodio.
- 8.9. Acetileno de alta pureza (C₂H₂, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.
- 8.10. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.
- 9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20%. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de sodio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de cesio tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de cesio. En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada (registrar en la ruta de análisis RIN08). Calcular la concentración de sodio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.
- 10.2. Para verificar el efecto matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra. Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.
- 10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / tratamiento de la muestra

- 11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 o 2.9, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas lípidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se quiere contenido soluble, analizar la concentración de sodio en el filtrado.

- 11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las muestras líquidas, previo a digerir, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de cesio tal que la concentración final sea de 10 % v/v. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.
- 11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

- 11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (Instructivo INE91).
- 11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:
- Lámpara de cátodo hueco de sodio
 - Longitud de onda: 589,0 nm ó 330,2 según la sensibilidad requerida. Ancho de rendija: 0,2 nm.
 - Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.
 - Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC)
 - Conectar el Combustible: acetileno
 - Conectar el Oxidante: aire
 - Tipo de llama: oxidante aire (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min).
 - Altura del quemador: 7 mm.
 - Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.
- 11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).
- De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.
- 11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.
- 11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 en tubo de plástico, con agua 8.2, cesio y ácido nítrico según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % para el cesio y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a medir las soluciones estándares de la curva de calibración.

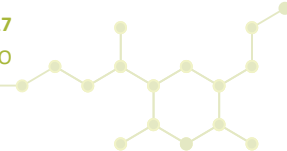
Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

- 11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).
- 11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de sodio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Na/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{EST} / d_s$$



donde:

C_s : corresponde a la concentración de sodio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s : corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T : corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua más el cesio.

d_{EST} : corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de sodio en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de sodio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Sodio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Na calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1 :

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a masa final del digesto en g

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 :

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio y agua)

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso contrario, corregir la toma de muestra por la densidad d_f .

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Sodio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f / (T_M \times d_{\text{dig}})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Na calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión en g.

12.5. Se determina la concentración de sodio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{\text{Na M AD}} \times V_{\text{MAD}} / d_{\text{Dig}} - C_{\text{Na M}} \times (V_{\text{MAD}} / d_{\text{Dig}} - T_{\text{AD}})) / (T_{\text{AD}} \times C_{\text{EST}}))$$

donde:

$C_{\text{Na M AD}}$: corresponde a la concentración de Na calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{\text{Na M}}$: corresponde a la concentración de Na, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} : corresponde a la concentración de sodio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} : corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig} : corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

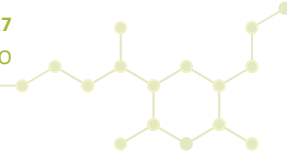
Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

13.1. Control de la sensibilidad del equipo: Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. Control de veracidad de la determinación: Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor



esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. 13.3. Control de la exactitud del método: Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de sodio obtenido debe estar en el rango 70 - 130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

- 13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70 - 130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.
- 13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 3-3 al 3-6; Método 3110 Metals by atomic absorption spectrometry pp. 3-14; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 3-14 a 3-20
- 14.3. SHIMADZU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.
- 14.4. ISO 9964-1 Water quality- Determination of sodium and potassium- part 1: Determination of sodium by atomic absorption spectrometry, 1st edition 1993 - 05-01.



3164UY

Determinación de Cromo en su estado de oxidación VI, soluble en: aguas, aguas residuales y otras matrices ambientales digeridas



Método espectrofotométrico

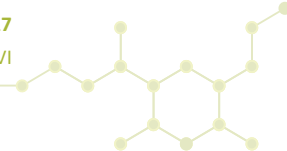
Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se usa para determinar cromo (Cr) en su estado de oxidación VI, soluble en: aguas, aguas residuales y otras matrices ambientales digeridas, a partir de 0,004 mg/L con celda de 5 cm (límite de cuantificación). Es posible determinar mayores concentraciones por dilución de la muestra. El límite de detección es de 0,0008 mg/L. También es aplicable a aguas salinas o salobres.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos.” (1017UY)
- 2.6. Procedimiento: “Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.” (3276UY)
- 2.7. Instructivos de uso de balanzas (INE 06, INE 07)
- 2.8. Instructivos de uso de Espectrofotómetro (INE 39, INE 40 e INE 99)
- 2.9. Instructivos de uso de analizador de iones (INE 98)
- 2.10. Instructivos de uso de bomba de vacío (INE 02)
- 2.11. Instructivos de uso del destilador para la preparación de agua destilada (INE 36)
- 2.12. Instructivos de uso del desionizador para la preparación de agua desionizada (INE 28)
- 2.13. Rutas de análisis (RIN 14, RIN 15 y RIN 17)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El Cr VI en medio ácido ($\text{pH } 2,0 \pm 0,5$) forma un complejo desconocido de color rojo violáceo con difenilcarbazida. La intensidad es determinable en un espectrofotómetro a 540 nm aproximadamente. El contenido de cromo VI se determina mediante una curva de calibración. En muestras de aguas naturales y aguas residuales se determina Cr VI soluble luego de ser filtradas por 0,45 μm .

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes resistentes a ácidos y lentes de seguridad.
- 4.2. El agregado de ácidos concentrados realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Turbidez remanente a la filtración o color es un obstáculo que se elimina midiendo la muestra previo al desarrollo de color y descontando su absorbancia de la absorbancia de la muestra o usándola como cero en la celda de referencia.
- 5.2. Alto contenido de molibdeno (Mo) o mercurio (Hg) (en más de 200 mg/L) y V (en más de 10 veces el contenido de cromo) pueden interferir. Estas concentraciones no son usuales en muestras ambientales, por lo que no serán consideradas en el presente procedimiento.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de plástico (polietileno o equivalente) lavado por inmersión en una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua (HNO_3 : HCl : H_2O) en proporciones 1:2:9, al menos durante 12 horas, o bolsa de polietileno hermética descartable para muestras líquidas. Dejar cámara de aire de 20 mL. La muestra típica es de 500 mL, o una alícuota de muestra para metales tóxicos sin acidificar. En caso de no analizar antes de las 24 horas, proceder a filtrar según 11.1 y ajustar el pH entre 9,3 y 9,7 adicionando 1 mL de solución buffer (8.12) más 600 μL de 5 N de NaOH cada 100 mL de muestra. Si es necesario agregar más soda 5 N o 1 N para llevar la muestra al rango del pH. Nunca usar un volumen de preservante mayor al 10 % del volumen de la muestra. Almacenar las muestras a una temperatura $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) y analizarlas dentro de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

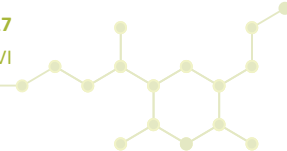
- 7.1. Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 160-A (INE 39 e INE 40) o espectrofotómetro UV-3100 J.P Selecta (INE 99).
- 7.2. Cubetas de vidrio o cuarzo de 1 cm y 5 cm de camino óptico.
- 7.3. Analizador de iones (Thermo Scientific Orion StarVersa o similar) (INE 98)
- 7.4. Electrodo ión selectivo de hidrógeno Ross combinado (Orión 8102BN), con su solución de relleno y buffers de calibración.
- 7.5. Balanza de resolución de 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.6. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 µL y 1000 µL).
- 7.7. Tubos de plástico con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad.
- 7.8. Micropipetas de volumen variable de 10 a 1000 µL.
- 7.9. Jeringas de plástico descartables y filtros de nylon, acetato de celulosa o fibra de vidrio de 0,45 µm de tamaño de poro adaptables a jeringas. Alternativamente usar un equipo de filtración con filtros del mismo tamaño de poro y tipo de material, pero de 47 mm de diámetro y bomba de vacío (INE 02).
- 7.10. Erlenmeyers de 50 - 125 mL de capacidad.
- 7.11. Frasco de vidrio color ámbar.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.3. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9): preparar una solución de concentración aprox. 0,2 N a partir de ácido sulfúrico concentrado al 95-98 %, Merck SX1244 o equivalente por dilución con agua.
- 8.4. Solución de dilución: acidificar agua con solución de ácido sulfúrico hasta pH $2,0 \pm 0,5$ siguiendo los pasos indicados en el INE del analizador correspondiente.
- 8.5. Solución estándar de 1000 mg/L de cromo VI: disolver 0,1414 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$, Nro. CAS 7778-50-9 PA) previamente secado en agua y diluir a 50 g en tubo de plástico con agua. Determinar la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Es estable por 1 año.
- 8.6. Solución intermedia: preparar por peso un estándar intermedio de cromo VI (de aproximadamente 10 mg/L), en tubo de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L diluyendo con solución de dilución. Medir la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Vigencia de éste estándar 60 días.
- 8.7. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.5): estándar de concentración y densidad conocida de origen comercial o preparado como en 8.5 a partir de otro lote de dicromato de potasio. Vigencia de éste estándar 6 meses.
- 8.8. Ácido fosfórico (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2): ácido fosfórico concentrado, 85 % Baker 0260-01 o equivalente.
- 8.9. Solución de difenilcarbazida: disolver unos 250 mg de 1,5 difenilcarbazida (PA Sigma D-7766 Nro. CAS 140-22-7 o equivalente) en 50 mL de acetona. Almacenar en frasco de vidrio color ámbar, descartar cuando se modifique su color, cuando cambia a amarillo-marrón.
- 8.10. Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 M: pesar 40 g de NaOH PA y diluir en 1 L de agua 8.2.
- 8.11. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5 M: pesar 200 g de NaOH PA y diluir en 1 L de agua 8.2.
- 8.12. Buffer: disolver 33 g de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$ Nro. CAS 7783-20-2) en 75 mL de H₂O desionizada, agregar 6,5 mL de hidróxido de amonio y llevar a 100 con agua. Preparar en pequeños volúmenes.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre que aparece subrayado

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua (HNO_3 : HCl : H_2O) en proporciones 1:2:9, al menos durante 12 horas. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio. En la determinación de pH, enjuagar exhaustivamente el electrodo entre muestras.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cromo VI, entre ellos un cero, en tubos de plástico, a partir de 8.5 u 8.6 diluyendo con solución de dilución. Volumen final de cada solución 10 mL. Registrar toma del estándar utilizado y volumen final. Vigencia de estos estándares 1 día.
- 10.2. Agregar 0,2 mL de solución de difenilcarbazida, homogeneizar. Registrar en el RIN 14. Si se van a utilizar celdas de mayor volumen tomar un volumen mayor manteniendo la relación de difenilcarbazida /muestra. Esperar al menos 10 min para el total desarrollo del color previo a la medida.

Para la medida en el espectrofotómetro

- 10.3. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro en el modo espectro según el que corresponda.
- 10.4. Determinar el pico de máxima absorbancia (aprox. 540 nm) para un estándar de concentración intermedia usando como cero de absorbancia el agua de dilución.
- 10.5. Pasar el equipo al modo de medida con la longitud de onda determinada en el punto 10.4.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Desarrollo de color (registrar en el RIN 14)

- 11.1. En muestras de aguas naturales, aguas residuales se determina Cr VI soluble, por lo que primeramente deben filtrarse por 0,45 μm . Otras matrices ambientales (residuos sólidos, suelos) digeridas ya están filtradas por el mismo tratamiento.
- 11.2. Calibrar el analizador de iones respecto a pH según el instructivo correspondiente.
- 11.3. Realizar una toma de la muestra de aproximadamente 50 g, en peso, en un Erlenmeyer. En el caso de soluciones de digestión medir la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Agregar 0,25 mL (unas 5 gotas) de ácido fosfórico, acidificar la muestra con solución de ácido sulfúrico a $\text{pH } 2,0 \pm 0,5$. Luego del ajuste de pH volver a pesar la muestra.
- 11.4. Proseguir como 10.2 y 10.5. Manteniendo la proporción de difenilcarbazida/muestra.
- 11.5. Si la medida de la muestra excede el valor más alto de la curva, realizar nuevamente el desarrollo de color con menor muestra y solución de dilución. Si se trata de una muestra digerida, medir la densidad de la muestra diluida pesando lo que descarga una pipeta calibrada.
- 11.6. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.2, adicionarle uno de los estándares 8.5, 8.6, o 8.7, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. Verificar esto en muestras digeridas, en efluentes y en otras muestras dudosas (por ejemplo aquellas que desarrollan un color diferente al rojo violáceo. Para estas muestras, además se sugiere ver el espectro como se indica en 10.4 pero usando muestra en vez de estándar para ver si el perfil del espectro indica probable interferencia en la longitud de onda de medida). Si existe efecto matriz, preparar una curva de calibración como se indica en 10.1 pero usando la muestra acidificada según 11.2 en vez de solución de dilución (tener en cuenta para la preparación, el punto 11 del procedimiento 3276UY Determinación por adiciones estándares).
- 11.7. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente un estándar.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cromo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } C \text{ (mg Cr VI/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{\text{EST}} / d_s$$

donde:

C_s : es la concentración de cromo VI en mg/L, del estándar utilizado

T_s : es la toma en g del estándar utilizado

M_T : es la masa total, en g, del estándar utilizado, más la solución de dilución más la solución de difenilcarbazida.

d_{EST} : es la densidad de cada solución estándar de la curva.

d_s : es la densidad del estándar utilizado para la preparación de la curva de calibración.

12.2. Si la absorbancia de la muestra no diluida, es menor al menor punto de la escala informar como menor que el límite de cuantificación, si se requiere un límite menor usar celdas de mayor paso óptico y preparar estándares de menor concentración.

12.3. Se determina la concentración de cromo en la muestra y blanco (CM y CB) o en una dilución de los mismos interpolando en la curva de calibración preparada con los estándares usando un procesador de datos comercial (Excel o equivalente).

12.4. Graficar Absorbancia en función de la concentración. Los valores obtenidos ajustan a una recta:

$$\text{Abs} = a \times \text{Conc Cr VI (mg/L)} + b$$

donde:

a y b: los coeficientes de la curva

12.5. Se determina la concentración de cromo VI en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$C_{M'} \text{ mg/L} = (\text{Abs mtra} - b) / a$$

12.5.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cromo VI, mg/L} = C_M \times \text{FD}_M$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cr VI calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L.

FD_M : corresponde al factor de dilución de la muestra peso/peso, en g/g. Este valor viene de la dilución de la muestra con el reactivo de color.

12.5.2. Para muestras sólidas:

$$\text{Cromo VI, mg/kg} = (C_M \times \text{FD}_M \times d_{\text{DM}'} / d_{\text{DM'Di}}) - C_B \times \text{FD}_B \times M'f / (T \times \text{Fh} \times d_{\text{DM}'})$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cr VI calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L.

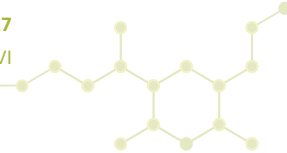
FD_M : corresponde al factor de dilución de la muestra digerida peso/peso, en g/g

$d_{\text{DM}'}$: corresponde a la densidad de la digestión de la muestra medida en 11.3, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

$d_{\text{DM'Di}}$: corresponde a la densidad de la digestión de la muestra diluida medida en 11.5, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

C_B : corresponde a la concentración de Cr VI en la digestión del blanco en mg/L

FD_B : corresponde a la factor de dilución del blanco peso/peso, en g/g



M^f: corresponde a la masa final de la digestión de la muestra, en g.

T: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

Fh: corresponde al factor de corrección por humedad.

Nota 3: se asume densidad del blanco de 1 g/mL. En caso contrario realizar la corrección en el cálculo.

Nota 4: el factor de corrección por humedad se utiliza solo en el caso de que la toma de muestra sea de muestra húmeda.

12.5.3. Calcular el porcentaje de recuperación, en caso de fortificar la muestra según:

$$\% \text{ de Recuperación Cr VI} = 100 \times \left(\frac{C_{CrMAD} \times V_{MAD} - C_{CrM} \times (V_{MAD} - T_{AD})}{T_{AD} \times C_{EST} \times d_{DM}} \right) \times d_{EST}$$

donde:

C_{CrMAD}: corresponde a la concentración de Cr VI, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/l

C_{CrM}: corresponde a la concentración de Cr VI, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra sin adicionar

T_{AD}: corresponde a la Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de cromo VI del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de estándar adicionado más muestra, en g

d_{DM}: corresponde para muestras digeridas, densidad de la muestra medida en 11.3

d_{EST}: corresponde a la densidad del estándar adicionado en g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la exactitud: Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés, el contenido de cromo VI obtenido debe estar en el rango 75 - 125% del contenido real.

Evaluar la exactitud de la determinación usando un estándar preparado a partir de 8.7. La concentración del mismo debe estar en el rango 75 - 125% del contenido real. En caso de contar con los gráficos de control correspondientes, los límites quedaran fijados por estos

13.2. Adición de estándar: Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar en el rango 75 - 125%.

13.3. Control de la precisión: Se debe realizar el desarrollo de color al menos un duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por serie de muestras. Se acepta hasta un 20 % como rango normalizado. En caso de existir gráficos de control, los límites quedaran fijados por este.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU UV160A, SHIMADZU CORPORATION, ANALYTICAL INSTRUMENT DIVISION.

14.2. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 3500 -Cr B Colorimetric method pp. 3-69 a 3-70.

14.3. Method 7196A. Environmental Protection Agency. Julio 1992.



3190UY

Determinación de elementos trazas en aguas naturales por plasma acoplado inductivamente con detector de masas (ICP – MS)



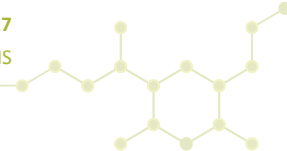
Elaborado - V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable a la determinación de los elementos establecidos en la Tabla 1, en aguas naturales digeridas, o no. Para algunas muestras, estos límites pueden verse modificados por características propias de la matriz o tratamiento previo, debiéndose informar el límite de reporte correspondiente.

Tabla 1

| Elemento | Rango µg/L |
|----------|------------|
| Li | 5-2500 |
| Be | 1-2500 |
| B | 500-2500 |
| Al | 120-2500 |
| Cr | 3-500 |
| Mn | 5-2500 |
| Fe | 50-2500 |
| Co | 1-2500 |
| Ni | 10-500 |
| Cu | 4-500 |
| Zn | 30-500 |
| As | 2-500 |
| Se | 4-500 |
| Ag | 0,4-250 |
| Cd | 0,2-500 |
| Sb | 4-500 |
| Ba | 50-2500 |
| Pb | 2-500 |

Nota 1: Los rangos establecidos en la Tabla 1 corresponden a muestras digeridas y diluidas 1/10. Para muestras donde se analice contenido soluble, los límites inferiores de reporte serán un orden menor.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.”(3237UY)
- 2.6. Procedimiento: “Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.”(3236UY)
- 2.7. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE94).
- 2.8. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18), ALTON PAAR (INE 71).
- 2.9. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28, INE 82).
- 2.10. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 36, INE 109).
- 2.11. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 43)
- 2.12. Instructivos de uso del ICP-MS (INE 120)
- 2.13. Registro de patrones calibrados y equipos controlados(RGC 32)
- 2.14. Instructivo de uso de la centrifuga (INE 49)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Este procedimiento describe la determinación simultánea de los elementos señalados en la Tabla 1, por el método de plasma acoplado inductivamente con detector de masas (ICP-MS). Las muestras líquidas son introducidas en el equipo mediante un nebulizador. El aerosol resultante es transportado por gas argón a la antorcha de plasma de radio-frecuencia de alta temperatura, donde los elementos target son desolvatados, atomizados e ionizados. Los iones generados son introducidos, por medio de una interfase de vacío, en el espectrómetro de masas. Los iones introducidos se separan por la relación masa/carga y son detectados por el electromultiplicador. La concentración de los elementos en las muestras se determina mediante una curva de calibración apropiada.
- 3.2. Si se requiere el contenido total de los analitos, las muestras deben ser digeridas usando los métodos de preparación apropiados (2.5, 2.6). Muestras con turbidez menor o igual a 1 NTU pueden ser analizadas para contenido total sin digestión previa. Para el análisis de contenido soluble se requiere filtración de las muestras por filtro con tamaño de poro 0,45 μm previo a la acidificación y la digestión no es necesaria.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.
- 4.2. Realizar el agregado de ácidos bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. Realizar el lavado de material con ácido con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

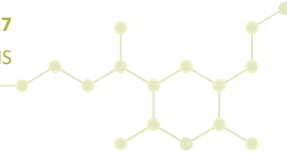
- 5.1. Las interferencias isobáricas en ICP-MS están causadas por isótopos de elementos diferentes que forman iones atómicos con la misma relación masa a carga (m/z). Estas pueden ser minimizadas por el uso de ecuaciones de interferencia adecuadas. Otra posibilidad es seleccionar otro isótopo del analito a determinar, que no se encuentre interferido.
- 5.2. Las interferencias de iones doble cargados o las interferencias isobáricas moleculares en ICP-MS están causadas por iones que tienen más de una carga o átomo, respectivamente.
Estas son corregidas por ecuaciones de interferencia apropiadas basadas en la constancia de las relaciones isotópicas observadas para las especies interferentes. Para minimizar este tipo de interferencias es indispensable la optimización de la tuning del equipo de manera de reducir la generación de especies doble carga y de óxidos. La celda de reacción (octopolo) ayuda a la reducción de las interferencias moleculares para algunos de los elementos analizados.
- 5.3. Las interferencias físicas o no espectroscópicas están asociadas a la nebulización de la muestra, al proceso de transporte, así como a la eficiencia de ionización. El estándar interno puede ser utilizado para corregir las interferencias físicas. La elección correcta del estándar interno a utilizar para cada analito debe ser de forma tal que los dos se vean afectados de igual manera por la matriz.
- 5.4. Las interferencias de memoria o carry-over pueden ocurrir cuando son analizados secuencialmente muestras y estándares entre los que hay una gran diferencia de concentración. El tiempo de enjuague entre dos muestras debe ser lo suficientemente largo para eliminar las interferencias significativas de memoria.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o vidrio de borosilicato de 250 mL para aguas naturales con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
- 6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 μm . Analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente.
- 7.2. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).
- 7.3. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
- 7.4. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 μL).



- 7.5. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos plástico compatibles con autosampler.
- 7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 μm .
- 7.7. Filtros de 0,45 μm de tamaño de poro de policarbonato o ésteres de celulosa.

8. REACTIVOS

- 8.1. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente. El ácido nítrico a utilizar debe cumplir 13.5 para cada elemento analizado.
- 8.2. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.4. Soluciones estándares: son necesarias soluciones estándares certificados individuales o multi elementales de los siguientes elementos: Litio, Berilio, Boro, Aluminio, Cromo, Manganeseo, Hierro, Cobalto, Níquel, Cobre, Cinc, Arsénico, Selenio, Plata, Cadmio, Antimonio, Bario, Plomo, Merck Certipur® 1.09492.0100, TraceCert® 92091 o similar. Cuando se preparan so-luciones multielementales a partir de estándares individuales, tener en cuenta precipitacio-nes u otras incompatibilidades. Es necesaria la utilización de soluciones de diferente origen para la preparación de la curva y los controles de calidad.
- 8.5. Solución estándar interno conteniendo: Bi, Ge, In, Li^6 , Lu, Rh, Sc, Tb, de concentración aproximada 1 mg/L en 5 % de HNO_3 .
- 8.6. Solución de tuning/optimización de instrumento, conteniendo Cerio, Cobalto, Litio⁷, Magne-sio, Talio, Ytrio, de concentración 1 $\mu\text{g/L}$ en 2 % HNO_3 . Tuning solution for ICP-MS 7500cs, part. Nro. 5185-5959.
- 8.7. Argón de alta pureza (Ar Nro. CAS 7440-37-1; 99,99 %).
- 8.8. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.1 en agua destilada 8.2

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio no descartable utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.8, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.3. Evitar la contaminación del material ya preparado con particulado ambiental, manteniéndolo cubierto. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras previas a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de limpia, solo abrirlas durante la medida.
- 9.3. Mantener especial cuidado para evitar la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
- 9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar multielementales, más un cero, por peso utilizando balanza 7.3 en tubos de plástico, a partir de la solución estándar 8.4 diluyendo con ácido nítrico 8.1 y agua 8.3 tal que la concentración final de ácido sea del 2 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cada elemento en cada uno de los estándares según 12.1.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

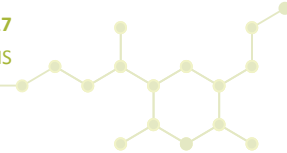
- 11.1. Preparación de la muestra: Si corresponde digerir la muestra según el procedimiento adecuado. En muestras de aguas naturales con turbidez menor a 1 NTU se determina el contenido total sin necesidad de una digestión previa. En caso de que se requiera determinar el contenido soluble, filtrar la muestra según 6.2. Si la muestra fue digerida según 2.5 o 2.6, realizar la dilución necesaria para que la concentración final de ácido HNO₃ sea aproximadamente 2 % v/v. En el caso de muestras filtradas, realizar el agregado necesario de HNO₃ para que la concentración final de este sea aproximadamente 2 % v/v. Registrar la toma de muestra, volúmenes finales de digestión, tomas para dilución y densidades (si es necesario medirlas) en el RIN 43. Para las muestras sin digerir y con HNO₃ 2 % se considera densidad igual a 1 g/mL.
- 11.2. Analizar 1 duplicado de digestión o dilución cada 5 muestras, mínimo uno por batch.
- 11.3. Para verificar el efecto de la matriz como se indica en 13.4, adicionar a una muestra del batch, una cantidad conocida del estándar 8.4, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser lo suficientemente concentrado para no diluir la matriz. Analizar una muestra fortificada cada 5 muestras. Para las muestras que fueron digeridas, hacer adiciones antes de la digestión. Para la determinación del contenido soluble de metales, hacer adiciones luego de la filtración, preferentemente inmediatamente antes del análisis.

Medida

- 11.4. Condiciones de operación del instrumento: seguir los pasos 1 a 3 del INE 120 para iniciar el equipo, encender el plasma y optimizar los parámetros de operación del instrumento según lo establecido en los manuales del mismo. Imprimir el reporte del Tune y anexarlo a los reportes de resultados para el batch.
- 11.5. Verificar configuración del método de medida según punto 4 del INE 120, incluyendo concentraciones de las soluciones de calibración y de los estándares internos. En este punto también deberá hacerse la asignación de los elementos para la corrección por estándar interno (usar el Virtual Internal Standar - VIS).
- 11.6. Las masas a determinar para cada elemento y el modo de medición son los indicados en la Tabla 2.

Tabla 2

| Metal | Masa a determinar | Modo de medición |
|-------|-------------------|------------------|
| Li | 6 | No gas mode |
| Be | 9 | No gas mode |
| B | 11 | No gas mode |
| Al | 27 | No gas mode |
| Cr | 52 | He mode |
| Mn | 55 | No gas mode |
| Fe | 56 | He mode |
| Co | 59 | No gas mode |
| Ni | 60 | No gas mode |
| Cu | 63 | No gas mode |
| Zn | 66 | No gas mode |
| As | 75 | No gas mode |
| Se | 78 | He mode |
| Ag | 107 | No gas mode |
| Cd | 111 | No gas mode |
| Sb | 121 | No gas mode |
| Ba | 137 | No gas mode |
| Pb | 208 | No gas mode |



- 11.7. Además se deben determinar las masas necesarias para la ecuaciones de interferencia (estas son cargadas por el software automáticamente cuando se seleccionan las ecuaciones de interferencia) y las correspondientes a los estándares internos utilizados. 1
- 11.8. Crear la secuencia de medida en el software del equipo según punto 5 del INE 120, incluyendo: curva de calibración del instrumento, verificación de la calibración, análisis de muestras incluyendo las diluciones efectuadas a las mismas, muestras de control de la calidad, blancos y función de apagado del equipo una vez terminada la secuencia.
- 11.9. Correr la secuencia (punto 5.2 del INE 120).

12. ANÁLISIS DE LOS DATOS

12.1. Análisis de datos a partir de una planilla de cálculo:

- 12.1.1. Calcular la concentración de cada elemento en las soluciones estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/L}) = C_s \times (T_s / d_s) / (M_T / d_{\text{sol}})$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración del elemento en $\mu\text{g/L}$, del estándar utilizado 8.4 o diluciones intermedias preparadas a partir de este.

T_s : corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T : corresponde a la masa total de solución en g.

d_s : corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.4 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

d_{sol} : corresponde a la densidad final de la solución estándar preparada, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

- 12.1.2. Construir una curva de calibración graficando la señal corregida por estándar interno proporcionada por el equipo (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

Se determina la concentración de cada elemento en la digestión de la muestra (CM), o en una dilución de la misma interpolando la señal corregida por estándar interno proporcionada por el equipo para la muestra (A), en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2).

$$\text{CM} = (A - b) / m$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la señal para la muestra a determinar

Se determina la concentración final de cada elemento en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración total, } \mu\text{g/L} = (\text{CM} \times \text{FD}_1 \times \text{FD}_2)$$

donde:

CM: corresponde a la concentración calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en $\mu\text{g/L}$.

FD_1 y FD_2 : corresponde a los factores de dilución para la muestra digerida o filtrada.

12.1.3. Cálculo de FD_1 :

$$FD1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto o solución acidificada en g.

d_{dig} : corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida o acidificada, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir o acidificar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), para muestras acuosas con una concentración de HNO_3 menor igual a 2 %, se asume $d = 1$ g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión o dilución, en g.

12.1.4. Cálculo de FD_2 : solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD2 = \frac{P_f/d_f}{P_M/d_M}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_M : corresponde a la densidad de la muestra, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra, en g.

Se considera 1g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df .

12.2. El análisis de datos puede realizarse desde el software del equipo:

12.2.1. Luego de la determinación realizar el ajuste de las curvas de calibración en el ICP-MS usando los estándares en el rango apropiado (ver punto 6.1 del INE 120). El equipo posee técnicas de regresión apropiadas para determinar las curvas de calibración para cada analito, incluyendo algoritmos que permiten la ponderación de diferentes puntos de curva para encontrar un mejor ajuste al modelo (1/conc). Luego de establecidas las calibraciones apropiadas reprocesar el batch según el punto 6.2 del INE 120 e imprimir los reportes.

12.2.2. Se determina la concentración del analito en la muestra sin adicionar y adicionada interpolando en la curva de calibración.

12.2.3. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{MAD} \times V_{MAD}/d_{MAD} - C_M \times (V_{MAD}/d_{MAD} - T_{AD}/d_{TAD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

C_{MAD} : corresponde a la concentración final calculada en la muestra adicionada, en $\mu\text{g/L}$.

C_M : corresponde a la concentración final calculada en la muestra sin adicionar en $\mu\text{g/L}$.

T_{AD} : corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

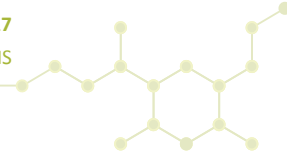
C_{EST} : corresponde a la Concentración del estándar adicionado, en $\mu\text{g/L}$.

d_{TAD} : corresponde a la densidad del estándar adicionado en g/mL.

V_{MAD} : corresponde a la Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{MAD} : corresponde a la densidad de la muestra calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 4: Se puede asumir densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo. Para muestras acuosas con una concentración de HNO_3 menor igual a 2 %, se asume $d = 1$ g/mL.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Control de la sensibilidad del equipo:** En cada calibración se verifica la sensibilidad utilizando una solución estándar preparada a partir de 8.4, de concentración similar al mínimo valor a reportar. Al usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis, en función de las muestras y la normativa específica.
- 13.2. Control de veracidad de la determinación:** Verificación inicial de la calibración del instrumento: evaluar la calibración del equipo usando un estándar preparado por peso a partir de 8.4, utilizando balanza 7.3, de origen independiente a la curva, y de concentración dentro del rango de calibración. Este será medido inmediatamente después de los estándares de calibración.
- La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90 - 110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.
- Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del instrumento no ha cambiado desde la calibración inicial usando un estándar preparado por peso a partir de 8.4, utilizando balanza 7.3 de concentración dentro del rango de calibración. Este estándar será determinado cada 10 muestras aproximadamente.
- Los límites para la aceptación son el 90 - 110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.3. Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cada elemento determinado debe estar en el rango 70 - 130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
- 13.4. Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada según 11.3, calcular el % de recuperación de la adición (12.4). Este debe estar dentro del rango 70 -130 %.
- 13.5. Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La concentración obtenida deberá ser menor a la del límite de reporte. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.
- 13.6. Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.
- Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.
- 13.7. Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un $R^2 = 0,995$ para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su señal en la curva de calibración no debe diferir en más del 20 % respecto a la concentración real.

En caso de incumplimiento de alguno de los controles de calidad, evaluar la pertinencia de repetir el análisis, en función de las muestras y la normativa específica.

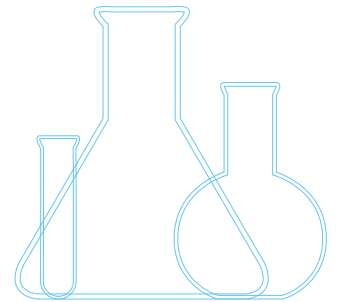
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard method for examination of water and wastewater, 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 3125 A Metals by inductively coupled plasma – mass spectrometry; Introduction y 3125 B Inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS) Method pp. 3-46 a 3-56.
- 14.2. EPA, Method 6020 Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry, September 1994, Revision 0.



3.2

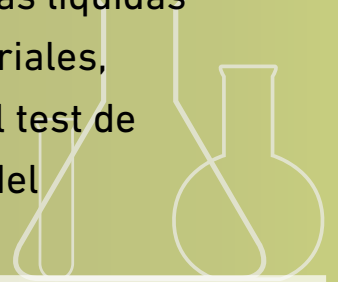
Tratamiento de la muestra y control de calidad





3236UY

Digestión asistida por microondas de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de metales.



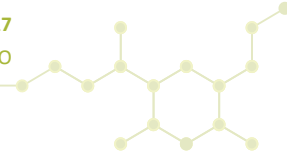
Elaborado - R. Huertas

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc. para la determinación del contenido de metales. Dado que esta metodología no está diseñada para lograr la descomposición total de la muestra, las concentraciones del analito extraído pueden no reflejar el contenido total en la muestra.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07)
- 2.6. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18) y ANTON PAAR (INE 71)
- 2.7. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 28)
- 2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 36)
- 2.9. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49)
- 2.10. Ruta de análisis (RIN 07)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre determinable por espectrofotometría de absorción atómica, la muestra es sometida a irradiación de microondas durante unos minutos, lo que provoca un rápido calentamiento y aumento de presión, dependiendo de la materia orgánica presente.
- 3.2. El procedimiento implica la digestión de una alícuota representativa de la muestra (25 mL) con 5 mL de ácido nítrico, en un recipiente cerrado de teflón, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Una vez fría la muestra se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución sobrenadante.
- 3.3. Con este método se logra la digestión en menor tiempo que con el método convencional, calentamiento en plancha calefactora y se minimiza la contaminación debida tanto al ambiente del laboratorio como a la contaminación cruzada entre muestras.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes apropiados.
- 4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.
- 4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.
- 4.6. Para el caso del digestor CEM, previo a la conexión del sensor de presión, purgar el mismo para la eliminación de burbujas de aire que puedan estar retenidas impidiendo un correcto control de la presión. Conectar el sensor al recipiente que se estime, por su aspecto, posea la mayor cantidad de materia orgánica.
- 4.7. Colocar el tubo de venteo del equipo a una campana de extracción o directamente al exterior del laboratorio.
- 4.8. Luego de finalizada la digestión esperar a que la presión sea menor a 15 psi antes de desconectar el sensor de presión. Una vez desconectado, purgar la línea sensora con agua para evitar corrosiones en el equipo. Llevar el rotor a una campana de extracción y abrir cuidadosamente los recipientes, usando guantes resistentes a ácidos.

Nota 1: cada equipo de digestión presenta sus condiciones de seguridad que deberán ser incorporadas a la rutina de trabajo.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver 9.2.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L de capacidad de cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
- 6.2. Preservar ajustando a $\text{pH} < 2$ con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Se recomienda analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura (CEM MDS-2100, ANTON PAAR Multiwave 3000, o similar).
- 7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón con tapa, contratapa para cierre hermético y cierre que contiene la membrana de ruptura o el sistema de seguridad que corresponda al modelo del equipamiento
- 7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.
- 7.4. Membranas de ruptura de teflón PFA (CEM MDS-2100).
- 7.5. Balanza de resolución 0,001 g.
- 7.6. Dispensador de ácidos de 5 mL de volumen o pipeta graduada de 5 mL.
- 7.7. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.
- 7.8. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

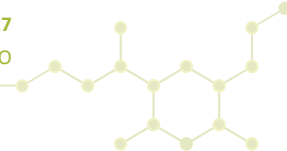
- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico concentrado (HNO_3 cc Nro. CAS 7697-37-2) al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida y así evitar daños al magnetrón del equipo, y nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.
- 9.2. Para muestras con contenido de materia orgánica mayor a 0,5 g, o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases esperar hasta que no haya más desprendimiento de vapores para cerrar los recipientes de digestión.
- 9.3. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Digestión de la muestra con equipo de microondas CEM MDS-2100.

- 11.1.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con su tapa con una precisión de 1 mg (P_1).
- 11.1.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 25 mL, registrar el peso total (P_2) correspondiente al recipiente mas la muestra. Utilizar la tapa especial para conexión al sensor de presión en aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.
- 11.1.3. Agregar, con pipeta graduada o dispensador, 5 mL de ácido nítrico. Registrar el peso de la bomba tapada luego del agregado del ácido (P_3).
- 11.1.4. Realizar por lo menos un blanco con 25 mL de agua 8.2 y 5 mL ácido nítrico.
- 11.1.5. Cerrar fuertemente las bombas con la contratapa para asegurar hermeticidad. Colocar la membrana de ruptura y conectar el sensor de presión al recipiente correspondiente. Posicionar los recipientes con sus camisas de protección en el rotor y éste en el digestor. Conectar cada uno al recipiente recolector de pérdidas.
- 11.1.6. Encender el microondas, seleccionar el programa digestión:
Para efluentes y aguas naturales seleccionar el programa EPA para muestras acuosas (SW-3015):

| Paso | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|-----|----|----|----|----|
| Potencia (%) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Presión máx. (psi) | 80 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Tiempo de corrida (min) | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tiempo a P máxima (max) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota 4: La potencia indicada es para una digestión a capacidad máxima, 12 bombas. Si el número de bombas a digerir es menor a 12, disminuir proporcionalmente la potencia.

Nota 5: En caso de que el equipo no cuente con biblioteca de métodos, las condiciones de corrida deberán ser validadas por el laboratorio.

- 11.1.7. Correr el programa. Si el programa se corta por superación de la presión y ruptura de la membrana, dejar enfriar antes de abrir y repetir el proceso con una toma menor de muestra.
 - 11.1.8. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas (ver que la presión de la bomba que posee el sensor sea menor a 15 psi) para evitar la expulsión de vapores ácidos. Pesar la bomba más la tapa con la muestra digerida (P_4)
 - 11.1.9. Realizar el cálculo de pérdida de peso como se indica en 12.1.
 - 11.1.10. Separar el sólido remanente de la digestión por decantación, de no ser posible, centrifugar o filtrar con papel de filtro.
 - 11.1.11. Pasar la solución digerida a tubos de plástico donde se almacena hasta su determinación.
 - 11.1.12. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando con una pipeta calibrada, un volumen conocido.
- 11.2. Digestión de la muestra con equipo de microondas ANTÓN PAAR Multiwave 3000
- 11.2.1. Registrar el peso del recipiente de digestión (bomba) con una precisión de 1 mg en la ruta de análisis correspondiente (P_1).
 - 11.2.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 25 mL, registrar el peso total (P_2) correspondiente al recipiente mas la muestra.
 - 11.2.3. Agregar, con pipeta graduada o dispensador, 5 mL de ácido nítrico. Registrar el peso de la bomba luego del agregado del ácido (P_3).
 - 11.2.4. Realizar por lo menos un blanco con 25 mL de agua 8.2 y 5 mL ácido nítrico.

Nota 6: Ubicar en la posición 1 del rotor (ubicación del sensor de temperatura / presión) aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.

- 11.2.5. Cerrar las bombas con las tapas sin presionar en exceso. Para la bomba a ser ubicada en la posición uno, cerrar y hacer un giro opuesto de 45°. Colocar el sensor de temperatura en la posición uno del rotor. Tapar el rotor y ubicarlo en el digestor. Cerrar la puerta del equipo.
- 11.2.6. Encender el equipo con la llave POWER ubicada en la parte delantera del equipo. Presionar F1 para seleccionar el método US EPA SW-3051. Seleccionando nuevamente F1 se presenta el detalle del método. Para editar (modificar) el método seleccionar F2, para iniciar la corrida seleccionar F1.

Nota 7: Los programas están diseñados para rotor completo, en el caso de no contar con muestras a digerir para completar el rotor, cargar las bombas sobrantes con el reactivo utilizado en la digestión.

- 11.2.7. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento.
- 11.2.8. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas. Pesar la bomba con la muestra digerida (P4).
- 11.2.9. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacena hasta su determinación.
- 11.2.10. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando con una pipeta calibrada, un volumen conocido.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la pérdida de peso en la digestión según:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = 100 \times (P_4 - P_3) / (P_3)$$

12.2. Calcular la toma de muestra según:

$$TM \text{ (g)} = P_2 - P_1$$

12.3. Calcular la masa final de digestión según:

$$MF \text{ (g)} = P_4 - P_1$$

donde:

P₁: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

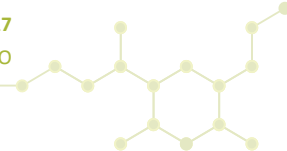
P₂: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra, en g.

P₃: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más ácido antes de la digestión, en g.

P₄: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más ácido después de la digestión, en g.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de pérdida de peso:** si es mayor al 10 % realizar nuevamente la digestión con menor toma de muestra.
- 13.2. **Control de la precisión:** Para aguas naturales, realizar al menos un duplicado cada tres muestras mientras que los efluentes se analizan todos por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente (ver procedimiento de determinación del metal).
- 13.3. **Control de la exactitud:** Siempre que sea posible evaluarla digiriendo simultáneamente con la muestra, un material de referencia certificado o solución de control de metales preparada por control de calidad. Tener en cuenta que de esta manera se determina la exactitud de la digestión más la determinación (ver procedimiento de determinación del metal).



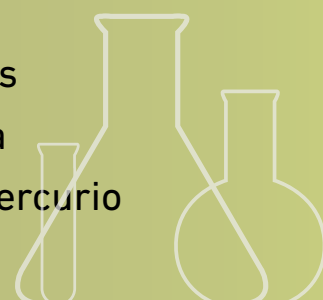
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.
- 14.2. MDS-2100 - OPERATION MANUAL. Microwave Sample Preparation, CEM CORPORATION. 1994.
- 14.3. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3015. USEPA. Washington, D.C.
- 14.4. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Métodos 3030 D Digestion for metals y 3030 K Microwave-assisted digestion, pp.3-7 a 3-9 y 3-11 a 3-13
- 14.5. Manual de instrucciones - Anton Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.



3237UY

Digestión de efluentes industriales y de aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio



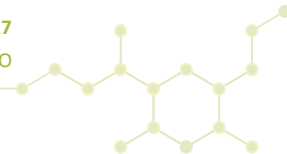
Elaborado - R. Huertas

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de efluentes industriales y aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07).
- 2.6. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 28).
- 2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 36).
- 2.8. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.9. Ruta de análisis (RIN 07).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre determinable por Espectrometría atómica, una alícuota representativa de la muestra (50 mL) se digiere en Erlenmeyer, en plancha calefactora, con 5 mL de ácido nítrico, hasta obtención de una solución límpida. Una vez fría la muestra, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución sobrenadante.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica, guantes apropiados.
- 4.2. El agregado de ácidos y la digestión deben realizarse bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido debe ser realizado con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. Siempre que fuese necesario el agregado de ácido o agua durante la digestión, esperar que la temperatura descienda y hacer deslizar la solución sobre las paredes del Erlenmeyer para evitar proyecciones.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN

- 6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L de capacidad de cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.
- 6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Plancha calefactora capaz de alcanzar temperaturas mayores a 150 °C, Cole Parmer o similar.
- 7.2. Erlenmeyers de vidrio de 125 a 250 mL
- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07)
- 7.4. Dispensador de ácidos de volumen variable o pipeta graduada de 5 mL
- 7.5. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41 o equivalente, libre de cenizas.
- 7.6. Recipientes de plástico de 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Mantener la ebullición moderada para evitar pérdidas de muestra por proyecciones de la misma fuera del Erlenmeyer. Se puede emplear vidrios reloj para reducir la pérdida de solución por evaporación, y evitar al mismo tiempo contaminación cruzada por proyecciones de las muestras.
- 9.2. En casos donde los límites requeridos no sean alcanzados con la medida directa en el espectrofotómetro de absorción atómica, es necesario recurrir a la concentración de las muestras de aguas naturales. El factor de concentración dependerá de cada muestra en particular, siendo posible en la mayoría de las veces, concentrar en un factor de 10.
- 9.3. Evitar la evaporación completa de la muestra porque puede ocurrir adsorción del analito de interés a las paredes del Erlenmeyer y/o pérdidas de metales volátiles por sobrecalentamiento.
- 9.4. Evitar contaminación de la muestra durante la manipulación o digestión teniendo especial cuidado por ser la digestión en un sistema abierto.
- 9.5. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en una solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego se enjuagan tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

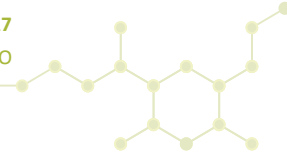
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión de la muestra

- 11.1. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma en peso de aproximadamente 50 mL con una precisión de 1 mg y agregar con pipeta graduada o dispensador 5 mL HNO_3 conc. Registrar los pesos del Erlenmeyer: vacío (P_1) y con muestra (P_2).
- 11.2. En cada corrida de digestión, realizar un blanco con 50 mL de agua desionizada y 5 mL de HNO_3 conc.
- 11.3. Colocar los Erlenmeyer en la plancha, calentar hasta obtención de una solución clara; si es necesario agregar más ácido y aumentar la potencia del calentamiento. No se debe permitir en ningún momento que se evapore completamente la solución.
- 11.4. Dejar enfriar, pesar el Erlenmeyer más la muestra digerida (P_3). En el caso que existan residuos que no sean decantables ni centrifugables, filtrar la muestra digerida con papel de filtro. Recoger el filtrado en un recipiente de plástico, donde se almacena la muestra digerida para su posterior determinación.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V_f \text{ (mL)} = (P_3 - P_1) / d$$

donde:

P_1 : corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P_3 : corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra más ácido luego de la digestión, en g.

d corresponde a la densidad del digesto en g/mL, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL.

12.2. Calcular la toma de la muestra según:

$$T_M \text{ (mL)} = (P_2 - P_1)$$

donde:

P_1 : corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P_2 : corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra previo a la digestión, en g.

Nota 3: Se asume densidad de muestras acuosas de 1 g/mL. En caso contrario calcular como el volumen que descarga una pipeta calibrada, en g, sobre el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL). Corregir la toma de muestra.

12.3. Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** siempre que sea posible evaluarla digiriendo simultáneamente con la muestra, un material de referencia o solución de control de metales preparada por control de calidad. Tener en cuenta que de esta manera se determina la exactitud de la digestión más la determinación.

13.2. **Control de la precisión:** si se trata de efluentes industriales, se deben realizar todas las muestras por duplicado, para el caso de aguas naturales, realizar un duplicado cada cuatro muestras, mínimo uno por corrida. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado el procedimiento del metal correspondiente.

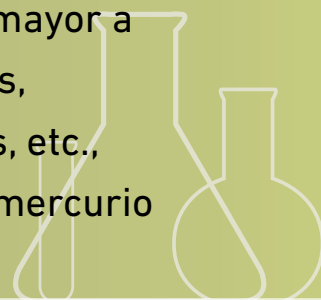
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 3030 D Digestion for metals y 3030 E Nitric Acid Digestion pp 3-7 a 3-9.



3238UY

Digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de lixiviados, etc., para la determinación del contenido total de mercurio



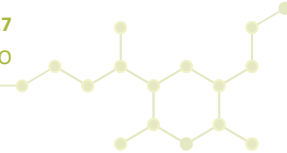
Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de lixiviación (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de mercurio.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo^o (3141UY)
- 2.6. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 96)
- 2.7. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18) y ANTON PAAR (INE 71)
- 2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 109 o INE 36)
- 2.9. Instructivo de uso de desionizador (INE 82 o 28)
- 2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49)
- 2.11. Ruta de análisis código (RIN 07B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de absorción atómica, la muestra es sometida a irradiación de microondas durante unos minutos, lo que provoca un rápido calentamiento y aumento de presión, dependiendo de la materia orgánica presente.
- 3.2. El procedimiento implica la oxidación del mercurio presente en una alícuota representativa de la muestra (20 mL) con una solución de $\text{BrO}_3^-/\text{Br}^-$, digestión con 5 mL de ácido nítrico en un recipiente cerrado de Teflón, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Una vez fría la muestra se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose el mercurio total en la misma.
- 3.3. Con este método se logra la digestión en menor tiempo que con el método convencional (calentamiento en plancha calefactora) y se minimiza la contaminación debida tanto al ambiente del laboratorio como a la contaminación cruzada entre muestras.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes apropiados.
- 4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.
- 4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.
- 4.6. Para el caso del digestor CEM, previo a la conexión del sensor de presión, purgar el mismo para la eliminación de burbujas de aire que puedan estar retenidas impidiendo un correcto control de la presión. Conectar el sensor al recipiente que se estime, por su aspecto, posea la mayor cantidad de materia orgánica.
- 4.7. Colocar el tubo de venteo del equipo a una campana de extracción o directamente al exterior del laboratorio.
- 4.8. Luego de finalizada la digestión esperar a que la presión sea menor a 15 psi antes de desconectar el sensor de presión. Una vez desconectado, purgar la línea sensora con agua para evitar corrosiones en el equipo. Llevar el rotor a una campana de extracción y abrir cuidadosamente los recipientes, usando guantes resistentes a ácidos.
- 4.9. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos, extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.

4.10. El bromuro de potasio y el bromato de potasio, son altamente tóxicos. Tener especial precaución a la hora de manipular y disponer soluciones que los contengan. Se recomienda descartarlos en un recipiente separado.

Nota 1: cada equipo de digestión, presenta sus condiciones de seguridad que deberán ser incorporadas a la rutina de trabajo.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver 9.2.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 250 mL con contratapa de PTFE

6.2. Preservar utilizando ácido clorhídrico concentrado (8.10) en una proporción de 1 mL por cada 100 mL de muestra e indicándolo en la etiqueta. Tiempo recomendado para su análisis 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (CEM MDS-2100, ANTON PAAR Multiwave 3000, o similar).

7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón de 100 mL de capacidad con tapa, contratapa para cierre hermético y cierre que contiene la membrana de ruptura o el sistema de seguridad que corresponda.

7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.

7.4. Membranas de ruptura de teflón PFA (CEM MDS-2100).

7.5. Balanza de resolución 0,001 g.

7.6. Dispensador de ácidos de 5 mL de volumen o pipeta graduada de 5 mL.

7.7. Pipeta automática de 100 a 1000 μ L.

7.8. Pipeta automática calibrada de 1000 μ L.

7.9. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.

7.10. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico concentrado (HNO_3 cc Nro. CAS 7697-37-2) al 65 %, $d = 1,40$ g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado de mercurio 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar semestralmente.

8.5. Material de referencia certificado en matriz líquida. Deberá contener mercurio en sus formas orgánicas e inorgánicas.

8.6. Solución de hidroxilamina: disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina (NH_4OCl Nro. CAS 5470-11-1), Fluka 55459-250G o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes.

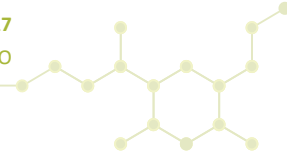
8.7. Solución de bromuro de potasio: disolver 5,95 g de bromuro de potasio (KBr Nro. CAS 7758-02-3) Merck 1.04905.0500 o equivalente, en 250 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes.

8.8. Solución de bromato de potasio: disolver 1,39 g de bromato de potasio (KBrO_3 Nro. CAS 7758-01-2) Merck 1.04912.0100 o equivalente, en 250 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes.

8.9. Solución de bromuro de potasio/bromato de potasio: mezclar partes iguales de las soluciones (8.7) y (8.8). Esta solución es estable por una semana.

8.10. Ácido clorhídrico: ácido clorhídrico (HCl cc Nro. CAS 7647-01-0), 38 %, $d=1,190$, J. T. Baker o similar.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.



Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida y así evitar daños al magnetrón del equipo. Nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.
- 9.2. Para muestras con alto contenido de materia orgánica o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, esperar hasta que no se generen más desprendimiento de gases y luego cerrar los recipientes de digestión.
- 9.3. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.4. Manejar las muestras en el sector de tratamiento de metales.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Se deberá tomar como referencia el procedimiento “Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo, 3141UY” (2.5).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Digestión de la muestra con equipo de microondas CEM MDS-2100
 - 11.1.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con su tapa con una precisión de 1 mg (P_1).
 - 11.1.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 20 mL, registrar el peso total (P_2) correspondiente al recipiente mas la muestra. Utilizar la tapa especial para conexión al sensor de presión en aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.
 - 11.1.3. Agregar, con pipeta graduada o dispensador, 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio (8.9) y 5 mL de ácido nítrico. Registrar el peso de la bomba tapada luego del agregado del ácido (P_3).
 - 11.1.4. Realizar por lo menos un blanco con 20 mL de agua, 0,2 mL de ácido clorhídrico, 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio y 5 mL ácido nítrico.
 - 11.1.5. Dentro de la planificación del batch de digestión se debe incluir también la curva de calibración y los controles de calidad correspondientes.
 - 11.1.6. Cerrar fuertemente las bombas con la contratapa para asegurar hermeticidad. Colocar la membrana de ruptura y conectar el sensor de presión al recipiente correspondiente. Posicionar los recipientes con sus camisas de protección en el rotor y éste en el digestor. Conectar cada uno al recipiente recolector de pérdidas.
 - 11.1.7. Encender el microondas, seleccionar el programa digestión:
Para efluentes y aguas naturales seleccionar el programa EPA para muestras acuosas (SW-3015):

| Paso | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|-----|----|----|----|----|
| Potencia (%) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Presión máx. (psi) | 85 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Tiempo de corrida (min) | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tiempo a P máxima (max) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota 4: La potencia indicada es para una digestión a capacidad máxima, 12 bombas. Si el número de bombas a digerir es menor a 12, disminuir proporcionalmente la potencia.

Nota 5: En caso de que el equipo no cuente con biblioteca de métodos, las condiciones de corrida deberán ser validadas por el laboratorio.

- 11.1.8. Correr el programa. Si el programa se corta por superación de la presión y ruptura de la membrana, dejar enfriar antes de abrir y repetir el proceso con una toma menor de muestra.
- 11.1.9. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas (ver que la presión de la bomba que posee el sensor sea menor a 15 psi) para evitar la expulsión de vapores ácidos. Agregar 0,25 mL de solución de hidroxilamina (8.6). Pesar la bomba más la tapa con la muestra digerida (P_4).

Nota 6: El agregado de la solución de hidroxilamina se debe realizar previo a la determinación. En el caso que la determinación se realice en días posteriores, previo se agrega la solución de hidroxilamina y luego se registra el (P_4).

- 11.1.10. Realizar el cálculo de pérdida de peso como se indica en 12.1
- 11.1.11. Separar el sólido remanente de la digestión por decantación. De no ser posible, centrifugar o filtrar con papel de filtro 11.1.11
- 11.1.12. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pasando el volumen que descarga de una pipeta calibrada de 1 mL

11.2. Digestión de la muestra con equipo de microondas ANTÓN PAAR Multiwave 3000:

- 11.2.1. Registrar el peso del recipiente de digestión (bomba) con una precisión de 1 mg en la ruta de análisis correspondiente (P_1).
- 11.2.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 20 mL, registrar el peso total (P_2) correspondiente al recipiente más la muestra.
- 11.2.3. Agregar, con pipeta graduada o dispensador, 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio (8.9) y 5 mL de ácido nítrico. Registrar el peso de la bomba tapada luego del agregado del ácido (P_3).
- 11.2.4. Realizar por lo menos un blanco con 20 mL de agua, 0,2 mL de ácido clorhídrico, 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio y 5 mL ácido nítrico
- 11.2.5. Dentro de la planificación del batch de digestión se debe incluir también la curva de calibración y los controles de calidad correspondientes.

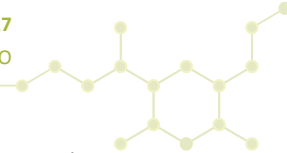
Nota 7: Ubicar en la posición 1 del rotor (ubicación del sensor de temperatura / presión) aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.

- 11.2.6. Cerrar las bombas con las tapas sin presionar en exceso. Para la bomba a ser ubicada en la posición uno, cerrar y hacer un giro opuesto de 45°. Colocar el sensor de temperatura en la posición uno del rotor. Tapar el rotor y ubicarlo en el digestor. Cerrar la puerta del equipo.
- 11.2.7. Encender el equipo con la llave **POWER** ubicada en la parte delantera del equipo. Presionar F1 para seleccionar el método US EPA SW-3015. Seleccionando nuevamente F1 se presenta el detalle del método. Para editar (modificar) el método seleccionar F2, para iniciar la corrida seleccionar F1.

Nota 8: Los programas están diseñados para rotor completo, en el caso de no contar con muestras a digerir para completar el rotor, cargar las bombas sobrantes con agua desionizada y los reactivos utilizados en la digestión.

- 11.2.8. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento. Dejar enfriar antes de abrir y referirse al manual del equipo.
- 11.2.9. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas. Agregar 0,25 mL de solución de hidroxilamina (8.6). Pesar la bomba con la muestra digerida (P_4).

Nota 9: El agregado de la solución de hidroxilamina se debe realizar previo a la determinación. En el caso que la determinación se realice en días posteriores, previo se agrega la solución de hidroxilamina y luego se registra el (P_4).



- 11.2.10. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro.
- 11.2.11. Realizar el cálculo de pérdida de peso como se indica en 12.1.
- 11.2.12. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando con una pipeta calibrada, un volumen conocido.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la pérdida de peso en la digestión según:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = 100 \times ((P_4 - \text{Peso de agregado de solución de hiroxilamina}) - P_3) / (P_3)$$

12.2. Calcular la toma de muestra según:

$$T_M \text{ (g)} = P_2 - P_1$$

12.3. Calcular la masa final de digestión según:

$$M_F \text{ (g)} = P_4 - P_1$$

donde:

P_1 : corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

P_2 : corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra, en g.

P_3 : corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más los reactivos antes de la digestión, en g.

P_4 : corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa luego de la digestión, en g.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** Digerir simultáneamente con las muestras, un material de referencia (8.5). Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación. Para el análisis de mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento (2.6).
- 13.2. **Control de la precisión:** Todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente. Para el caso de batch de muestras de características similares se puede realizar un duplicado cada 5 muestras.
- 13.3. **Blanco de digestión:** El control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra. Realizar un blanco de reactivos por cada digestión. Verificar que el valor del mismo no supere el límite de detección.

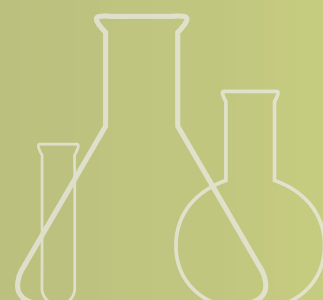
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.
- 14.2. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3015. USEPA. Washington, D.C.
- 14.3. ISO 12846, Water quality-Determinación of Mercury-Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and without enrichment, First edition 2012-04-15.
- 14.4. Manual de instrucciones - Antón Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas. MDS-2100 - OPERATION MANUAL. Microwave Sample Preparation, CEM CORPORATION. 1994.



3260UY

Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado



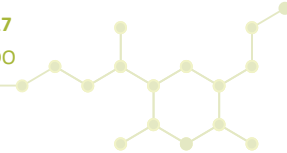
Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado. Puede usarse como método de calentamiento, tanto irradiación con microondas como plancha calefactora.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07).
- 2.6. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18) y Anton Paar (INE 71).
- 2.7. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 28).
- 2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 36).
- 2.9. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.10. Ruta de análisis (RIN 16).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El material particulado, suspendido en el aire ambiental, es recolectado en filtros de fibra de vidrio o cuarzo, por 24 horas, usando un muestreador de alto volumen. Cada muestra puede ser analizada en forma individual o se puede realizar una muestra compuesta analizando en forma conjunta los filtros recogidos durante un período de tiempo determinado.
- 3.2. Los metales asociados al material particulado, son solubilizados por una extracción ácida (HNO_3/HCl), quedando los analitos en forma libre, determinable por espectrofotometría de absorción atómica, la extracción es facilitada por un proceso de calentamiento con irradiación de microondas en sistema cerrado, o en sistema abierto en plancha calefactora.
- 3.3. Una vez realizada la digestión, la muestra se lleva a un volumen adecuado para su determinación, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación y se determinan los metales de interés en la solución sobrenadante.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Generales

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes apropiados.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.

En caso de realizar la extracción con microondas:

- 4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.
- 4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.
- 4.6. Para el caso del digestor CEM, previo a la conexión del sensor de presión, purgar el mismo para la eliminación de burbujas de aire que puedan estar retenidas, impidiendo un correcto control de la presión. Conectar el sensor al recipiente que se estime, por su aspecto, posea la mayor cantidad de materia orgánica.
- 4.7. Colocar el tubo de venteo del equipo a una campana de extracción o directamente al exterior del laboratorio.
- 4.8. Luego de finalizada la digestión, esperar a que la presión haya disminuido (menor a 15 psi) antes de desconectar el sensor de presión. Para el digestor CEM, una vez desconectado, purgar la línea sensora con agua para evitar corrosiones en el equipo. Llevar el rotor a una campana de extracción y abrir cuidadosamente los recipientes, usando guantes resistentes a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los filtros de fibra de vidrio, si bien son apropiados para el control de metales en aire, los blancos de los elementos metálicos son en general, altos y variables. Los blancos de filtros de fibra de cuarzo tienen menor variabilidad que los filtros de fibra de vidrio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Los filtros son recibidos doblados por la mitad con el material particulado hacia adentro y colocados en sobres o bolsas de protección. Preservar la muestra en su medio protector entre 15 °C y 30 °C hasta su análisis.
- 6.2. El tiempo máximo para realizar el seis meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

Procedimiento de extracción con microondas:

- 7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (CEM MDS-2100, Anton Paar Multiwave 3000, o similar).
- 7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón de 100 mL de capacidad con tapa, contratapa para cierre hermético y demás accesorios correspondiente a cada equipo en particular.
- 7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.
- 7.4. Membranas de ruptura de teflón PFA (CEM MDS-2100).

Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

- 7.5. Plancha calefactora capaz de alcanzar temperaturas mayores a 150 °C, Cole Palmer o similar.
- 7.6. Erlenmeyers de vidrio de 100 - 125 mL.

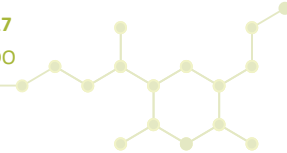
General:

- 7.7. Balanza de resolución 0,001 g
- 7.8. Dispensador de ácidos de 10 mL de volumen o pipeta graduada de 10 mL.
- 7.9. Centrífuga, embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente, o jeringas plásticas y filtros tipo Sartorius Minisart RC 15 o similar.
- 7.10. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) concentrado al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Ácido clorhídrico: ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, $d = 1,19 \text{ g/mL}$, Merck 1.00317 o equivalente.
- 8.5. Solución de digestión: solución al 5,55 % HNO_3 (v/v) / 16,75 % HCl (v/v). Para preparar 1 litro de solución agregar a 500 mL de agua (8.2), 55,5 mL de HNO_3 (8.3) y 167,5 mL de HCl (8.4), llevar a 1 litro. Se puede preparar individualmente en cada recipiente de digestión, manteniendo las proporciones de los constituyentes; 10 mL de solución: 555 μL de HNO_3 (8.3) y 1675 μL de HCl (8.4).
- 8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.7. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.



Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

Procedimiento de extracción con microondas:

- 9.1. Cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida, de forma de evitar daños al magnetrón del equipo. Nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.
- 9.2. Para muestras con contenido de materia orgánica mayor a 0,5 g o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, esperar hasta que no haya más desprendimiento de vapores para cerrar los recipientes de digestión.

Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

- 9.3. Mantener la ebullición moderada para evitar pérdidas de muestra por proyecciones fuera del Erlenmeyer.
- 9.4. Evitar la evaporación completa de la muestra, pues puede provocar pérdida de metales volátiles por sobrecalentamiento. Controlar la digestión y de ser necesario agregar agua desionizada periódicamente para mantener el volumen del digesto.
- 9.5. Evitar posible contaminación de la muestra durante la manipulación y/o digestión teniendo en cuenta que se trabaja en sistema abierto.

General:

- 9.6. Los filtros de fibra de cuarzo son muy frágiles y deben ser manejados con extremo cuidado.
- 9.7. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá descontaminarse por inmersión en solución 8.6, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.7. Luego enjuagar tres veces con agua (8.2). Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.8. Manejar las muestras en el laboratorio de tratamiento de metales.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Para proteger el filtro durante el cortado y evitar contaminaciones cruzadas, colocarlo abierto entre 2 hojas vírgenes de papel tipo A4 o similar, y posicionarlo en la guillotina. Cortar un trozo 2 cm x 20 cm. Repetir el procedimiento en caso de analizar por duplicado. Una vez obtenida la submuestra a analizar, retirar de la guillotina, guardar los sobrantes del filtro de la muestra original, tal como se indica en el punto 6.1, y proceder a la limpieza de la cuchilla de la guillotina. Para ello, pasar papel tissue o algodón por la misma hasta que salgan limpios.

Nota 3: Según bibliografía, el plomo en material particulado ambiental, se distribuye homogéneamente en el papel de filtro. Sin embargo cuando se realiza el muestreo cerca de carreteras se observa variabilidad a lo largo del filtro por lo que es necesario analizar trozos de papel adicionales por cada exposición.

11.2. Procedimiento de extracción con equipo de microondas CEM MDS-2100

- 11.2.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con su tapa, con una precisión de 1 mg (P_1), en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.2.2. Tarar la balanza y colocar el trozo de papel de filtro en el recipiente de digestión doblándolo dos veces por la mitad, registrar el peso de la muestra (P_2). Asegurarse que el filtro quede colocado adecuadamente de forma que al agregar la solución de digestión lo cubra en su totalidad, de ser necesario ayudarse con una pinza plástica o un tip de una pipeta de 10 mL.

11.2.3. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 10 mL de la solución de digestión (8.5).

Nota 4: De ser necesario correr blancos de digestión y de filtros por cada set de digestión.

11.2.4. Cerrar fuertemente las bombas con la contratapa para asegurar hermeticidad. Colocar la membrana de ruptura a los capuchones correspondientes (retirar la membrana de ruptura de la digestión anterior y colocar únicamente 1 membrana). Conectar el sensor de presión al recipiente correspondiente. Posicionar los recipientes con sus camisas de protección en el rotor, conectar a través de la línea de venteo cada bomba al recipiente de recolección de pérdidas. Ubicar el rotor en el digestor, asegurándose que el caño sensor no obstaculice el correcto movimiento del mismo. Con la puerta del digestor abierta, presionar la tecla F4, para verificar el adecuado posicionamiento y movimiento del rotor. Cerrar la puerta del equipo.

11.2.5. Encender el microondas, seleccionar el programa digestión:

EPA para muestras sólidas (SW-3051):

| Paso | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------|-----|----|----|----|----|
| Potencia (%) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Presión máx. (psi) | 85 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Tiempo de corrida (min) | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tiempo a P máxima (máx.) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota 5: La potencia indicada es para una digestión a capacidad máxima, 12 bombas. Si el número de bombas a digerir es menor a 12, disminuir proporcionalmente la potencia.

Nota 6: El tiempo a presión máxima o TAP, es el tiempo máximo al cual permanecerá el sistema bajo la presión seleccionada. Una vez alcanzada dicha presión, será mantenida por el tiempo estipulado o hasta que el tiempo de corrida finalice.

11.2.6. Correr el programa. Si el programa se corta por superación de la presión y ruptura de la membrana, dejar enfriar antes de abrir y repetir el proceso con una toma menor de muestra.

11.2.7. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas (ver que la presión de la bomba que posee el sensor sea menor a 15 psi) para evitar la expulsión de vapores ácidos. Agregar 10 mL de agua desionizada, mezclar y dejar reposar por 30 minutos. Este paso es crítico para permitir que el ácido difunda desde el filtro a la solución. Pesar la bomba más la tapa con la muestra digerida (P_3).

11.3. Digestión de la Muestra con equipo de microondas Antón Paar Multiwave 3000:

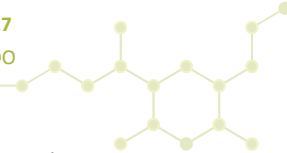
11.3.1. Registrar el peso del recipiente de digestión, con una precisión de 1 mg (P_1), en la ruta de análisis correspondiente.

11.3.2. Tarar la balanza y colocar el trozo de papel de filtro en el recipiente de digestión doblándolo dos veces por la mitad, registrar el peso de la muestra (P_2). Asegurarse que el filtro quede colocado adecuadamente de forma que al agregar la solución de digestión lo cubra en su totalidad, de ser necesario ayudarse con una pinza plástica o un tip de una pipeta de 10 mL.

Nota 7: Ubicar en la posición 1 del rotor (ubicación del sensor de temperatura / presión) aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.

11.3.3. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 10 mL de la solución de digestión (8.5).

Nota 8: De ser necesario, correr blancos de digestión y de filtros por cada set de digestión.



- 11.3.4. Cerrar las bombas con las tapas sin presionar en exceso. Para la bomba a ser ubicada en la posición 1, cerrar y hacer un giro opuesto de 45°. Colocar el sensor de temperatura en la posición uno del rotor. Tapar el rotor y ubicarlo en el digestor. Cerrar la puerta del equipo.
- 11.3.5. Encender el equipo con la llave POWER ubicada en la parte delantera del equipo. Presionar F1 para seleccionar el método US EPA SW-3051. Seleccionando nuevamente F1 se presenta el detalle del método. Para editar (modificar) el método seleccionar F2, para iniciar la corrida seleccionar F1.

Nota 9: Los programas están diseñados para rotor completo, en el caso de no contar con muestras a digerir para completar el rotor, cargar las bombas sobrantes con el reactivo utilizado en la digestión.

- 11.3.6. Correr el programa. Si el programa se corta no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento. Dejar enfriar antes de abrir y referirse al manual del equipo.
- 11.3.7. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas. Agregar 10 mL de agua desionizada, mezclar y dejar reposar por 30 minutos. Este paso es crítico para permitir que el ácido difunda desde el filtro a la solución. Pesarse la bomba más la tapa con la muestra digerida (P_3).

11.4. Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

- 11.4.1. Registrar el peso del recipiente de digestión, Erlenmeyer de 150 mL, con una precisión de 1 mg (P_1), en la ruta de análisis correspondiente.
- 11.4.2. Tarar la balanza y colocar el trozo de papel de filtro en el recipiente de digestión doblándolo dos veces por la mitad, registrar el peso de la muestra (P_2). Asegurarse que el filtro quede colocado adecuadamente de forma que al agregar la solución de digestión lo cubra en su totalidad, de ser necesario ayudarse con una pinza plástica o un tip de una pipeta de 10 mL.
- 11.4.3. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 10 mL de la solución de digestión (8.5).

Nota 10: De ser necesario correr blancos de digestión y de filtros por cada set de digestión.

- 11.4.4. Colocar el Erlenmeyer en la plancha calefactora, ubicada dentro de la campana de extracción, tapar el recipiente con un vidrio reloj y calentar a ebullición durante 30 minutos. No dejar que la solución de digestión se evapore a sequedad.
- 11.4.5. Retirar el Erlenmeyer de la plancha y dejar enfriar. Adicionar 10 mL de agua hasta alcanzar los 20 mL, enjuagando las paredes del recipiente y el vidrio reloj utilizado. Agitar y dejar reposar por 30 minutos. Este paso es crítico para permitir que el ácido difunda desde el filtro a la solución. Registrar el peso final del Erlenmeyer (P_3).

11.5. General:

- 11.5.1. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacenada hasta su determinación.
- 11.5.2. Determinar la densidad de la solución sobrenadante, pesando un volumen conocido con pipeta calibrada (d).

Nota 11: Tanto las fracciones de papel de filtro a digerir, como el volumen final del digesto pueden variar según el límite de cuantificación requerido para el ensayo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V_f \text{ (mL)} = (P_3 - P_2 - P_1) / d$$

donde:

P₁: corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P₂: corresponde al peso de muestra, en g.

P₃: corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra más ácido luego de la digestión, en g.

d: corresponde al densidad del digesto en g/mL.

12.2. Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

12.3. Una vez determinada la concentración del analito en µg/mL, calcular los µg de la muestra multiplicando por el volumen final de digestión. Luego corregir los µg totales según la fracción analizada del filtro, en caso de analizar una fracción de 2 cm x 20 cm, multiplicar por 12, que es el número total de fracciones que componen el filtro. Luego dividir dichos µg totales por el volumen total de aire que atravesó el filtro en m³. Dicho volumen se calcula multiplicando caudal, m³/minuto, por el tiempo operante del HighVol en minutos.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Evaluarla digiriendo simultáneamente con la muestra, un material de referencia en caso de poseerlo. Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación.

13.2. **Control de la precisión:** Todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.

14.2. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of sediment. Sludge, solids and oils. SW-846 Method 3051. USEPA. Washington, D.C.

USEPA. 1999. Selection, preparation and extraction of filter material. IO -3-1. USEPA. Washington, D.C.

14.3. Manual de instrucciones - Anton Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.

14.4. MDS-2100 - OPERATION MANUAL. Microwave Sample Preparation, CEM CORPORATION. 1994.

3261UY

Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia para la determinación de constituyentes no volátiles (metales). Lixiviación en medio ácido acético a pH 5, durante 18 horas.

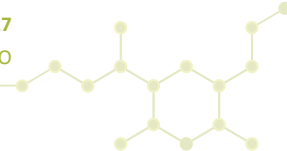
Elaborado - A. Mangarelli

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Para establecer si un residuo sólido es peligroso por su toxicidad al ambiente, se debe conocer los constituyentes que lixivian naturalmente del sólido al medio líquido.

Esta normativa técnica está diseñada para simular la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia.

Sometiendo el residuo sólido a este procedimiento, se obtiene un lixiviado para la determinación de constituyentes no volátiles (metales).

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Rutas de análisis códigos (RIN 17)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza (INE 06)
- 2.7. Instructivo de uso medidor de pH (INE 25)
- 2.8. Instructivo de uso estufas (INE 64 o INE 42)
- 2.9. Instructivo de uso mortero (INE 65)
- 2.10. Instructivo de uso baño de agua (INE 68)

3. RESUMEN DE MÉTODO

Para residuos que contienen menos de 0,5 % de sólidos, después de ser filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,6 - 0,8 μm de tamaño de poro, se le define como extracto TCLP (Procedimiento de Caracterización de Toxicidad de Lixiviado por sus siglas en inglés).

Para residuos que contienen más de un 0,5 % de sólidos, la fase líquida, se separa de la fase sólida y se almacena para posteriores análisis.

El tamaño de partícula de la fase sólida (tanto si proviene de las muestras líquidas con contenido de sólido > 0,5 % o muestras 100 % sólido) se reduce (si es necesario), se pesa y se mezcla con una cantidad de fluido extractante igual a 20 veces el peso de la fase sólida.

Se coloca en un sistema rotatorio y se hace girar a 30 r/min \pm 2 r/min durante 18 h \pm 2 h. La temperatura se debe mantener en 22 °C \pm 3 °C. El fluido extractante es seleccionado en función de la alcalinidad de la fase sólida del residuo.

La determinación de los análisis se realiza de acuerdo a los procedimientos correspondientes (EAA para metales) En el anexo 1, están esquematizadas las distintas etapas a seguir según el tipo de residuo.

3.1. Clasificación según tipo de muestra a ser analizada.

Las etapas previas al test de lixiviación dependen de la cantidad de sólidos que tiene la muestra. Según esta característica, se pueden diferenciar tres situaciones:

- 3.1.1. **Para residuos líquidos:** < 0,5 % de material sólido seco, el filtrado resultante de la filtración por filtro de fibra de vidrio de 0,6 – 0,8 μm es el lixiviado (LIXIV A).
- 3.1.2. **> 0,5 % sólidos**, donde se determina la concentración de contaminante en la fase sólida, y la fase líquida, y se suman los aportes.
- 3.1.3. **100 % sólido**, donde se ensaya el test de lixiviación a una porción de la muestra, con el reactivo lixivante.

3.2. Reducción de tamaño de partícula.

Previo a la extracción, si el material sólido tiene un área menor de 3,1 cm^2/g o tamaño mayor a 1 cm^2 se debe proceder a triturar o moler el sólido (es decir, cuando no pasan un tamiz estándar de 9,5 mm).

3.3. Extracción del material sólido.

La fase sólida se extrae con el reactivo lixivante adecuado en una relación igual a 20 veces el peso del sólido, con agitación permanente durante 18 h \pm 2 h. El reactivo de extracción empleado estará en función de la alcalinidad de la fase sólida. Ver anexo 2.

3.4. Separación final del extracto del sólido remanente:

Luego de la extracción, el líquido se separa de la fase sólida usando un filtro de fibra de vidrio de 0,6 a 0,8 μm . Si el líquido es coloreado o tiene una turbidez mayor a 1 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez) se debe realizar, previo a la determinación de los metales por espectroscopia de absorción atómica, una digestión con ácido nítrico.

3.5. Análisis del extracto del TCLP o lixiviado:

Las especies inorgánicas (metales) son determinados por los métodos de espectrofotometría de absorción atómica.

Si la fase líquida inicial del residuo (en aquellas muestras donde el contenido de sólidos era $> 0,5\%$) y el extracto de lixiviación son miscibles se pueden mezclar y analizar juntos. Si son inmiscibles, se analizan separadamente y los resultados se combinan matemáticamente para obtener una concentración promedio en volumen.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad.
- 4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. Tener la precaución de que en la mayoría de los casos se va a estar trabajando con material peligroso, por su potencial alta carga de contaminantes tóxicos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Se deben recolectar un mínimo de 500 g de muestra. Debido a la alta toxicidad potencial de estas muestras tomar especiales medidas de seguridad en su manejo.

Las muestras y los extractos obtenidos deben ser preparados para el análisis tan pronto como sea posible. Si se requiere preservación de los residuos, esta debe ser mediante refrigeración a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) y los tiempos de preservación se encuentran en la siguiente tabla:

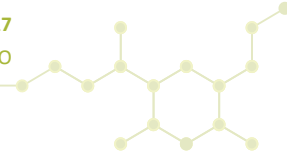
| Contaminante | Desde recolección hasta extracción TCLP (días) | Desde extracción TCLP hasta determinación (días) | Tiempo total transcurrido (días) |
|--------------------------|--|--|----------------------------------|
| Metales excepto mercurio | 180 | 180 | 360 |
| Mercurio | 28 | 28 | 56 |

En ningún caso se le deben agregar sustancias para preservar la muestra antes de la extracción.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de agitación: debe ser capaz de mantener una agitación permanente durante el periodo de lixiviación ($18\text{ h} \pm 2\text{ h}$), tal que el sólido no se estratifique. Se recomienda un equipo que pueda agitar los recipientes de extracción por inversión a $30\text{ r/min} \pm 2\text{ r/min}$ (véase anexo 3).
- 7.2. Recipientes de extracción: se necesitan recipientes con suficiente capacidad para contener la muestra y el reactivo de extracción, un mínimo de 2,1 litros. Pueden ser de vidrio borosilicato o plástico (no para el caso de lixivios a los cuales se analizará mercurio). Dependiendo del equipo de agitación, si es por inversión se necesitarán frascos herméticos, en caso contrario se pueden utilizar Erlenmeyer de vidrio borosilicato o plástico.
- 7.3. Sistema de filtración:

Es recomendable que todas las filtraciones se lleven a cabo en una campana de extracción. La filtración al vacío solo es aplicable para residuos con bajo contenido de sólidos ($< 10\%$) y para residuos altamente granulados que contienen líquidos. La filtración de otros tipos de residuos se debe realizar con presión positiva.



- Se puede utilizar cualquier equipo de filtración capaz de soportar un filtro de fibra de vidrio de 47 mm y la presión requerida para lograr la separación.
 - Filtros de fibra de vidrio libre de cenizas, sin aglutinantes y tener un tamaño efectivo de poro de 0,6 a 0,8 μm o equivalente.
 - Bomba de vacío de presión regulable entre 0,07 y 3,5 Kg/cm^2 . Cuando se determinan metales, los filtros deberán ser enjuagados con ácido nítrico 1 N antes de pasar la muestra, y posteriormente enjuagados con agua desionizada (como mínimo 1 L de agua para el enjuague)
- 7.4. Medidor de pH con una exactitud de $\pm 0,05$ unidades a 25 °C y electrodo de pH.
 - 7.5. Balanza de resolución 0,01 gramos.
 - 7.6. Erlenmeyer de vidrio de 250 a 500 mL y vidrio de reloj para cubrirlos.
 - 7.7. Baño de agua a 50 °C ± 2 °C.
 - 7.8. Agitador magnético.
 - 7.9. Tiras de pH (0-14)
 - 7.10. Estufa con control de temperatura para trabajar a 100 °C ± 5 °C

Nota 1: todo el material utilizado que tenga contacto con la muestra y el extracto, luego de lavado deberá enjuagarse por inmersión en una solución de HNO_3 al 50 % v/v durante toda la noche. Luego se enjuagan tres veces con agua desionizada.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 1 N: preparar a partir del HCl cc (37 %) PA, por dilución por un factor de 12.
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) 50 % v/v: preparar a partir del HNO_3 cc (65 %) PA, por dilución por un factor de 2.
- 8.4. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N: tomar 40 g de NaOH PA y diluir a 1 L.
- 8.5. Ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{-COOH}$ Nro. CAS 64-19-7) grado reactivo analítico.
- 8.6. Reactivos de extracción.
 - 8.6.1. Reactivo de extracción 1: añadir 5,7 mL de ácido acético glacial a 500 mL de agua desionizada, añadir 64,3 mL de NaOH 1 N y llevar a un litro. Verificar que el pH de este reactivo se encuentre entre 4,88 y 4,98 unidades de pH.
 - 8.6.2. Reactivo de extracción 2: diluir 5,7 mL de ácido acético glacial con agua desionizada a un volumen de 1 litro. Verificar que el pH de este reactivo se encuentre entre 2,83 y 2,93 unidades de pH.
El pH debe verificarse antes de usar el reactivo para asegurar que sea el correcto. Si se encuentran impurezas o soluciones coloreadas, se debe desechar el reactivo y preparar uno nuevo.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA (Ver anexo 1)

11.1. Selección del reactivo de extracción apropiado (véase anexo 2)

Pesar una fracción de la fase sólida, reducir (si es necesario) a un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm de diámetro o menor y transferir 5,0 g a un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Añadir 96,5 mL de agua desionizada al matraz, cubrir con un vidrio de reloj y agitar vigorosamente por 5

minutos, usando un agitador magnético. Medir el pH. Si el pH es menor de 5,0 usar el reactivo de extracción 1. Puede utilizarse tiras de pH, a excepción de aquellas muestras que indiquen pH en la zona de definición.

Si el pH es mayor a 5,0 añada 3,5 mL de HCl 1 N, mezcle y cubra con un vidrio de reloj, caliente a 50 °C en baño de agua y mantenga esta temperatura por 10 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente y medir el pH. Si éste es menor de 5,0 usar el reactivo de extracción 1. Si es mayor de 5,0 usar el reactivo de extracción 2. Puede utilizarse tiras de pH, a excepción de aquellas muestras que indiquen pH en la zona de definición.

11.2. Procedimiento de extracción.

- 11.2.1. Si el residuo es 100 % sólido, tomar una muestra de 100 g. Proseguir según punto 11.2.12. Solo se usará una toma menor en caso que el residuo sea de baja densidad y el volumen total de la solución de extracción supere el del recipiente de extracción.
- 11.2.2. Si el residuo contiene menos de 0,5 % de sólidos, la porción líquida del residuo, después de la filtración por 0,6 – 0,8 μm , se define como el extracto de lixiviación LIXIV A. Por lo tanto, se debe filtrar suficiente muestra para que la cantidad de líquido filtrado alcance para realizar todos los análisis requeridos. Proseguir a partir del punto 11.2.9.
- 11.2.3. Si el residuo contiene más del 0,5 % de sólidos y contiene líquidos libres se requiere una separación sólido-líquido. Determinar el tamaño óptimo de la muestra que se llevará a filtración para obtener 100 g de sólido.
- 11.2.4. Pese el filtro y el recipiente que recibirá el filtrado.
- 11.2.5. Ensamble al equipo de filtración y coloque el filtro en el soporte y asegúrelo.
- 11.2.6. La centrifugación se usará solamente como una ayuda de la filtración.
- 11.2.7. Transfiera cuantitativamente la muestra del residuo (fase líquida y sólida) al equipo de filtración. Vierta la muestra en forma uniforme sobre la superficie del filtro.
- 11.2.8. Aplique gradualmente vacío o presión de 0,07 – 0,70 kg/cm^2 , hasta que el aire o el gas de presurización pase a través del filtro. Si este punto no se alcanza a 0,70 kg/cm^2 ; y si no pasa líquido adicional por el filtro, en un intervalo de 2 minutos, lentamente incremente la presión en intervalos de 0,7 kg/cm^2 hasta un máximo de 3,5 kg/cm^2 . Cuando el gas de presurización comienza a pasar por el filtro, o cuando cesa el flujo de líquido a 3,5 kg/cm^2 y en un período de 2 minutos no hay un filtrado adicional, se detiene la filtración. Algunos residuos, como los aceitosos y de pintura, contienen material que tiene la apariencia de líquido. Pero si después de aplicar el vacío o presión en el punto 8.9, este residuo no pasa a través del filtro, se clasifica como 100 % sólido. No olvidar que no se debe reemplazar el filtro original con uno nuevo.
- 11.2.9. El material retenido en el filtro se define como la fase sólida del residuo, el filtrado como la fase líquida. Pese el filtrado (fase líquida). La fase líquida puede ser analizada o preservada a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$) y un tiempo máximo de 14 días.
- 11.2.10. Determine el peso de la fase líquida, restando el peso del recipiente vacío, del peso total del recipiente con el filtrado. Determine el peso de la porción sólida de la muestra restando el peso de la fase líquida del peso total de la muestra.
- 11.2.11. Prepare la porción sólida del residuo para extracción (punto 11.2.1). Cuando el tamaño de la partícula esté preparado adecuadamente, transfiera cuantitativamente 100 g del sólido a un recipiente de extracción. En el caso de haber realizado separación sólido-líquido incluya en el recipiente de extracción el filtro usado.
- 11.2.12. Determine la cantidad del reactivo de extracción necesario como sigue:

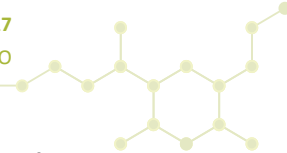
Para residuos 100 % sólido:

Peso del reactivo de extracción = 20 x peso de la toma de muestra

Para residuos con un contenido de sólido $> 0,5\%$:

Peso del reactivo de extracción = $\frac{20 \times \% \text{ de sólido seco} \times \text{peso de la toma de muestra}}{100}$

100



Lentamente añada la cantidad del reactivo de extracción al recipiente de extracción. Cierre el frasco herméticamente (es recomendable que se use cinta de teflón para asegurar un buen sello). Coloque el recipiente en el equipo de agitación rotatorio y haga girar a 30 r/min \pm 2 r/min durante 18 h \pm 2 h. Si el equipo de agitación no es el recomendado, se debe verificar periódicamente una agitación constante durante las 18 h \pm 2 h del proceso de extracción.

La temperatura deberá mantenerse 23 °C \pm 2 °C durante el periodo de extracción.

Conforme la agitación continúa se pueden generar gases que ejercen presión dentro del frasco extractor.

Para aliviar el exceso de presión, el frasco puede abrirse en una campana de extracción periódicamente.

11.2.13. Después de las 18 h \pm 2 h de extracción separe el lixiviado del sólido por medio de filtración a vacío o presión, a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,6 a 0,8 μ m.

11.3. Preparación del extracto obtenido.

11.3.1. Si el líquido filtrado resultante en el punto 11.2.3 es miscible con el lixiviado que se generó a partir de la porción sólida del residuo, los mismos se deben mezclar en una proporción líquido-sólido igual a la de la muestra. Este líquido combinado se define como el extracto de lixiviación LIXIV B. Prosiga según el procedimiento correspondiente.

11.3.2. Si la fase líquida inicial del residuo, no es miscible con el líquido filtrado resultante del punto no combine los líquidos. Analice por separado cada uno y combine los resultados matemáticamente, como se describe en el punto 12.1

11.3.3. Después de colectar el extracto de lixiviación LIXIV A se deberá medir el pH. Preserve el extracto LIXIV A para el análisis. Las alícuotas para determinar Hg deben conservarse con HCl cc 1mL cada 100 mL de muestra, aquellas para determinar CrVI con 600 μ L NaOH 5 N y 1 mL de buffer amonio cada 100 mL de muestra y las destinadas a la determinación de los demás metales deben acidificarse con ácido nítrico hasta un pH menor a 2.

11.3.4. Para el caso en que el extracto LIXIV A sea coloreado o la turbidez sea mayor a 1 NTU se debe proseguir con la digestión en ácido nítrico antes del análisis de metales, según procedimiento correspondiente.

Nota 3: Realizar por lo menos un ensayo en blanco de reactivos de extracción por cada batch.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Si las fases individuales van a ser analizadas separadamente, determine el volumen de la fase individual, realice los análisis requeridos y combine los resultados matemáticamente, usando un promedio volumen-peso, como se indica:

$$\text{Concentración final del constituyente} = \frac{(V1)(C1) + (V2)(C2)}{V1 + V2}$$

donde:

V1: corresponde al volumen del primer extracto (L)

C1: corresponde a la concentración del constituyente de interés en el primer extracto (mg/L)

V2: corresponde al volumen del segundo extracto (L)

C2: corresponde a la concentración del constituyente de interés en el segundo extracto (mg/L)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Exactitud:** En caso de contar con matrices testigo, (es decir una muestra con una composición equivalente a la que se va a analizar, a la que se ha agregado una cantidad conocida de (o los) constituyente(s) tóxico(s) que está(n) en estudio) para cada tipo de residuo (por ejemplo: lodos del tratamiento de aguas residuales, suelos contaminados, etc.) proceder al análisis de la mis-ma, incluyendo al menos 1 cada 5 muestras. El propósito de la matriz con testigo es dar seguimiento a la aplicación de los métodos usados y determinar cuando existe una interferencia debida a la matriz.

Si esto no es posible, como mínimo se deberán fortificar las muestras, previo a la determinación.

Seguir los controles de calidad de la metodología de determinación.

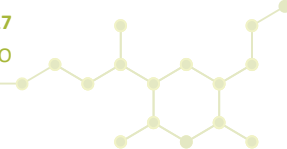
13.2. **Precisión:** Se realizarán todas las muestras por duplicado, con el objetivo de evaluar la dispersión de los datos. Se aceptará como máximo un 20 % como rango normalizado.

13.3. **Blanco:** Se debe realizar al menos un blanco de reactivos por batch.

14. BIBLIOGRAFÍA

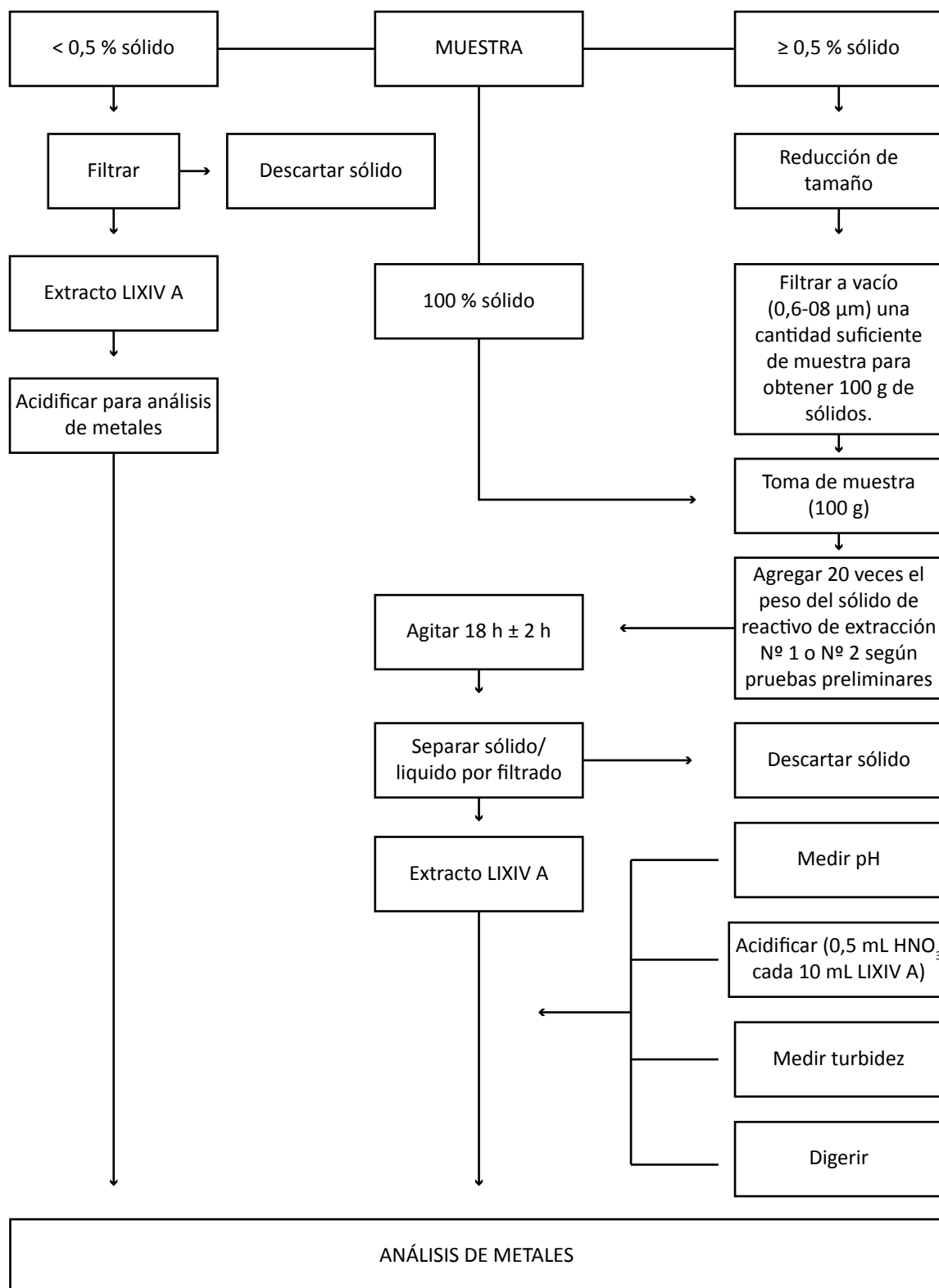
14.1. USEPA Method 1311. Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP). Code of Federal Regulations, Vol. 40, CFR Part 261 appendix II, 1991, U.S.A.

14.2. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECOL-1993 Para Control de Residuos Peligrosos que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. (Publicada en el D.O.F. de fecha 22 de octubre de 1993).



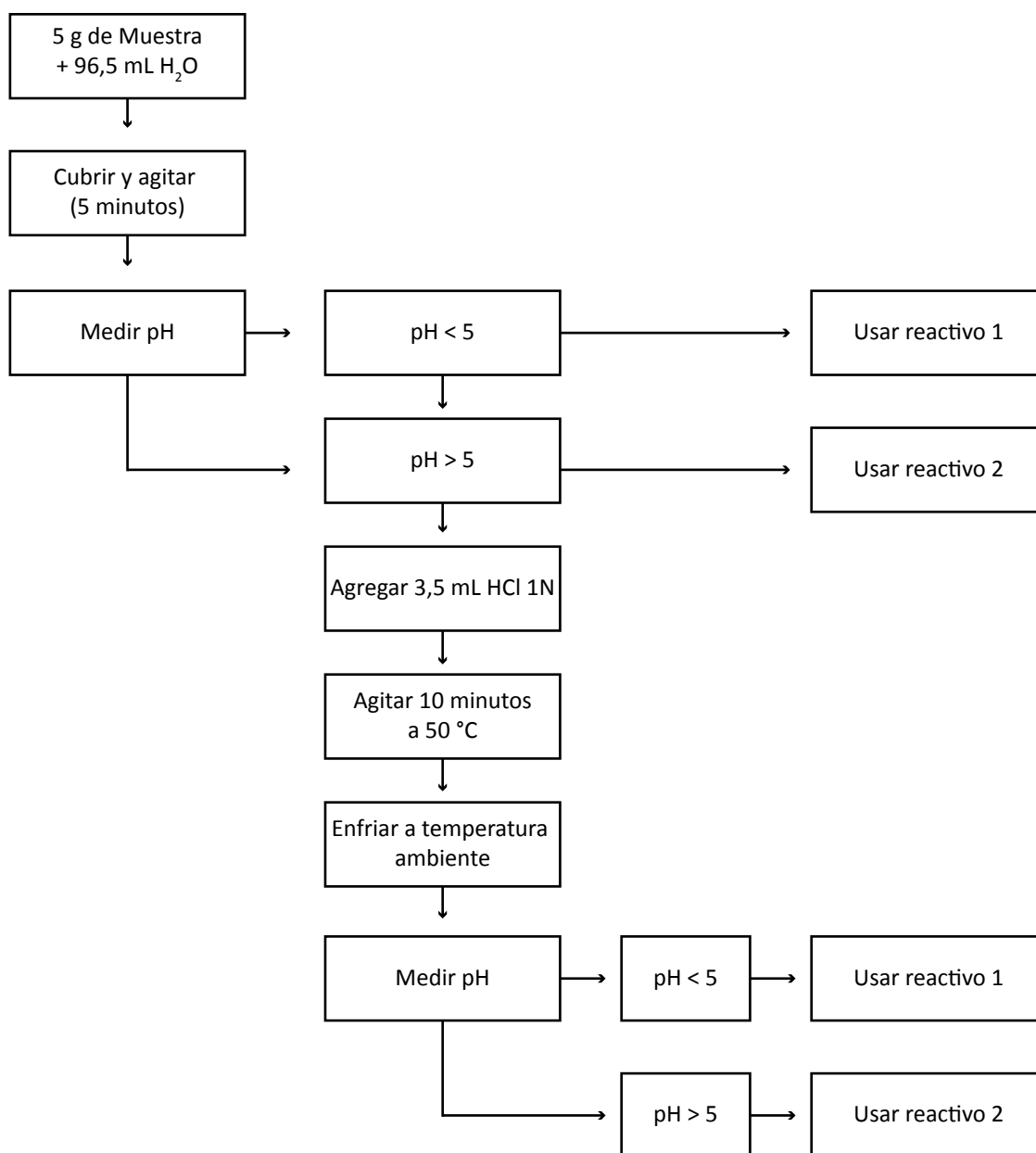
Anexo 1

Esquema del método de análisis



Anexo 2

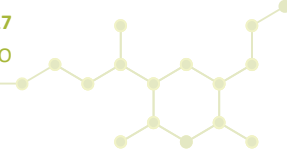
Selección del reactivo apropiado



Solución al doble de Ácido acético (CH_3COOH): 11,4 mL CH_3COOH en 1 L de H_2O

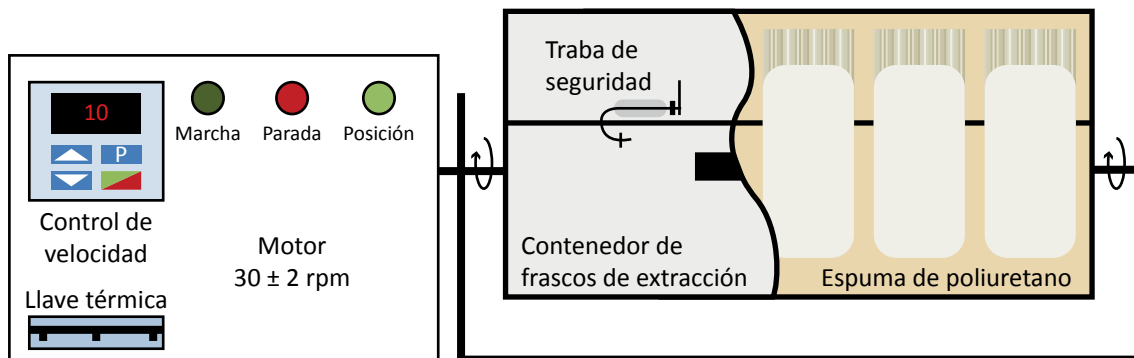
Reactivo 1: 1 L de solución al doble de Ácido acético
128,6 mL NaOH, 1N
Llevar a 2 L con H_2O
pH = $4,93 \pm 0,05$

Reactivo 2: 1 L de solución al doble de Ácido acético
Llevar a 2 L con H_2O
pH = $2,88 \pm 0,05$



Anexo 3

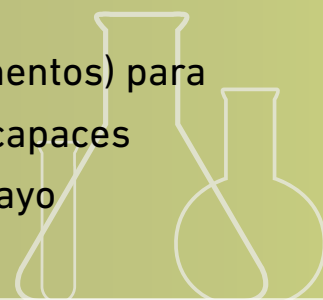
Equipo de agitación





3262UY

Digestión de matrices solidas (suelos, sedi-mentos) para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo



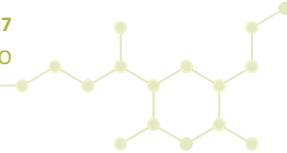
Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en la digestión de suelos, sedimentos y otras matrices sólidas, para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo (cromo, plomo, mercurio, arsénico, cadmio, cobre, níquel, zinc, entre otros).

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo.” (3141UY).
- 2.6. Procedimiento: “Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos suelos). Método Termogravimétrico.” (1050UY).
- 2.7. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 96).
- 2.8. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18) y Antón Paar (INE 71).
- 2.9. Instructivo para el uso del destilador (INE 109 o INE 36) e instructivo de uso de desionizador. (INE 82 o 28)
- 2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.11. Instructivo de uso de estufa de secado (INE 64).
- 2.12. Hoja de ruta (RIN 06)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y extraer todo el metal asociado a partículas a una forma libre, determinable por espectrofotometría de absorción atómica, la muestra es sometida a irradiación de microondas en sistema cerrado. Dicho proceso provoca un rápido calentamiento y un aumento de la presión, dependiente de la materia orgánica presente en la muestra.
- 3.2. El procedimiento implica la digestión de una toma representativa de muestra (0,3 – 1 g) con 10 mL de ácido nítrico concentrado, en un recipiente cerrado de PTFE, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Luego de la digestión, en el caso de analizar mercurio se realiza una oxidación con permanganato de potasio, y una vez frío el sistema, la muestra se lleva a un volumen adecuado para su determinación, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución sobrenadante.
- 3.3. Con este método se logra la digestión en menor tiempo que con el método convencional de calentamiento en plancha calefactora en sistema abierto y se minimiza, tanto la contaminación cruzada entre muestras, como la ocasionada por el ambiente del laboratorio. Para el caso de mercurio, el sistema cerrado evita pérdidas de este al ambiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes apropiados.
- 4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- 4.3. El lavado de material con ácido se debe realizar con guantes de plástico resistente a ácidos.
- 4.4. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos, extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver (9.2).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha de 500 mL, o en bolsa de muestreo descartable. Si se va a incluir el análisis de mercurio, recolectar la muestra en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 500 mL con contratapa de PTFE.
- 6.2. Preservar en heladera a temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su análisis. Tiempo recomendado de análisis antes de los 6 meses, excepto mercurio cuyo tiempo recomendado son 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

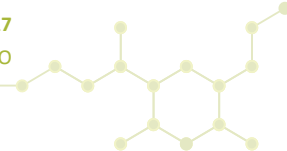
- 7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (CEM MDS-2100, Antón Paar Multiwave 3000, o similar).
- 7.2. Recipientes de digestión: bombas de PTFE de 100 mL de capacidad con tapa, contratapa para cierre hermético y demás accesorios correspondiente a cada equipo en particular.
- 7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.
- 7.4. Membranas de ruptura de PFA (CEM MDS-2100).
- 7.5. Balanza de resolución 0,001 g.
- 7.6. Dispensador de ácidos de 10 mL de volumen o pipeta graduada de 10 mL.
- 7.7. Pipeta automática de 100 a 1000 μL .
- 7.8. Pipeta automática calibrada de 1000 μL .
- 7.9. Centrífuga o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.
- 7.10. Recipientes de muestreo (mínimo de 500 mL de capacidad): frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha de 500 mL, o bolsa de muestreo descartable. Si se va a incluir el análisis de mercurio, recolectar la muestra en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 500 mL con contratapa de PTFE.
- 7.11. Placas de Petri.
- 7.12. Mortero y mano de ágata o porcelana.
- 7.13. Tamiz de polietileno de 2 mm de apertura de poro.
- 7.14. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.
- 7.15. Estufa de secado.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40\text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.
- 8.6. Solución de ácido nítrico para lavado de mercurio 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar semestralmente.
- 8.7. Material de referencia certificado en matriz sedimentos o similar. En el caso de mercurio, deberá contener dicho metal en sus formas orgánicas e inorgánicas.
- 8.8. Solución de hidroxilamina: disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina (NH_4OCl Nro. CAS 5470-11-1), Fluka 55459-250G o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por 1 mes.
- 8.9. Solución de permanganato de potasio: 5 g en permanganato de potasio (KMnO_4 Nro. CAS 7722-64-7) Merck 1.05082.0250 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Preparar previo a la determinación.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por su nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida y así evitar daños al magnetrón del equipo. Nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.
- 9.2. Alto contenido de materia orgánica (los recipientes de digestión admiten hasta 0,5 g de materia orgánica), o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, provocará un aumento importante de la presión en el interior del recipiente de digestión. Para estas muestras, una vez acidificadas, esperar hasta que no se desprendan más gases para cerrar los recipientes de digestión.
- 9.3. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución (8.4), mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución (8.5). Luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y secar en estufa a 100 °C. Los materiales utilizados para el análisis de mercurio, luego de lavado, deberán ser enjuaga por inmersión en solución (8.6) durante 12 h y luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y secar en estufa a 100 °C. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.4. Manejar las muestras en el sector de tratamiento de metales.
- 9.5. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico, contando con los sistemas de seguridad necesarios.
- 9.6. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.
- 9.7. Para el caso del digestor CEM, previo a la conexión del sensor de presión, purgar el mismo para la eliminación de burbujas de aire que puedan estar retenidas impidiendo un correcto control de la presión. Conectar el sensor al recipiente que se estime, por su aspecto, posea la mayor cantidad de materia orgánica.
- 9.8. Colocar el tubo de venteo del equipo a una campana de extracción o directamente al exterior del laboratorio.
- 9.9. Luego de finalizada la digestión esperar a que la presión haya disminuido (menor a 15 psi) antes de desconectar el sensor de presión. Para el digestor CEM, una vez desconectado, purgar la línea sensora con agua para evitar corrosiones en el equipo. Llevar el rotor a una campana de extracción y abrir cuidadosamente los recipientes, usando guantes resistentes a ácidos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Para mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento “Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo, 3141UY.”(2.7). Para el resto de los metales no corresponde.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Preparación de la muestra

- 11.1.1. Si la toma de muestra se va a realizar en seco, tomar una cantidad representativa de la muestra (aprox. 100 g), colocar en una placa de Petri y llevar a una estufa a 105 °C (para el caso del análisis de mercurio la temperatura debe ser menor a 60 °C), hasta peso constante. Previo al secado, retirar de la muestra cualquier componente ajeno al suelo y/o sedimento; como fracciones de roca de tamaño superior a 2 mm, así como hojas, tallos y raíces.

Nota 3: Si las características físicas de las muestras lo permiten, las mismas pueden ser tamizadas previo al secado.

- 11.1.2. Una vez seca la muestra es molida en un mortero teniendo la precaución de no romper fracciones de roca de tamaño superior a 2 mm, las mismas deben ser separadas previo a la molienda. La muestra una vez molida es tamizada y homogeneizada, esta última operación de ser necesario, puede ser realizada en mortero. Finalizado dicho procedimiento la muestra es colocada en un desecador hasta su digestión.
- 11.1.3. En caso de tener que realizar la toma de muestra húmeda, previo a la pesada determinar el porcentaje de humedad de la misma según (2.13). Considerar en el momento de realizar la toma la dilución producida por el contenido de humedad de la misma.

11.2. Digestión de la muestra con equipo de microondas CEM MDS-2100

- 11.2.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con su tapa con una precisión de 1 mg en la ruta de análisis correspondiente (P1).
- 11.2.2. Tarar la balanza y realizar una toma de aproximadamente 0,3 – 1 g de muestra, registrar el peso de muestra (P2).

Nota 4: Utilizar la tapa especial para conexión al sensor de presión en aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.

- 11.2.3. Agregar 10 mL de ácido nítrico concentrado (8.3).
- 11.2.4. Correr con cada set de digestión un material de referencia de matriz similar a las muestras a determinar.
- 11.2.5. Cerrar fuertemente las bombas con la contratapa para asegurar hermeticidad. Colocar la membrana de ruptura a los capuchones correspondientes (retirar la membrana de ruptura de la digestión anterior y colocar únicamente 1 membrana). Conectar el sensor de presión al recipiente correspondiente. Posicionar los recipientes con sus camisas de protección en el rotor, conectar a través de la línea de venteo cada bomba al recipiente de recolección de pérdidas. Ubicar el rotor en el digestor, asegurándose que el caño sensor no obstaculice el correcto movimiento del mismo. Con la puerta del digestor abierta, presionar la tecla F4, para verificar el adecuado posicionamiento y movimiento del rotor. Cerrar la puerta del equipo.

11.2.6. Encender el microondas, seleccionar el programa digestión:

EPA para muestras sólidas (SW-3051):

| Paso | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------|-----|----|----|----|----|
| Potencia (%) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Presión máx. (psi) | 85 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Tiempo de corrida (min) | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tiempo a P máxima (máx.) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

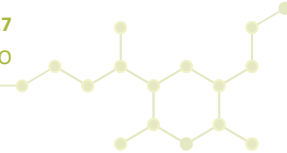
Nota 5: La potencia indicada es para una digestión a capacidad máxima, 12 bombas. Si el número de bombas a digerir es menor a 12, disminuir proporcionalmente la potencia.

Nota 6: El tiempo a presión máxima o TAP, es el tiempo máximo al cual permanecerá el sistema bajo la presión seleccionada. Una vez alcanzada dicha presión, será mantenida por el tiempo estipulado o hasta que el tiempo de corrida finalice.

- 11.2.7. Correr el programa. Si el programa se corta por superación de la presión y ruptura de la membrana, dejar enfriar antes de abrir y repetir el proceso con una toma menor de muestra.

Nota 7: El programa está diseñado para una toma de muestras de 0,5 g. En caso que la toma sea de 1 g, se debe correr el programa dos veces, con el fin de que la energía suministrada sea proporcional a la masa utilizada. En ambas corridas es necesario corroborar que la presión alcance 85 psi. Es conveniente realizar la primera corrida a una potencia menor de la correspondiente para el número de bombas utilizado, para evitar la ruptura de las membranas de seguridad, dejar descender la presión en la bomba sensora por debajo de 15 psi, y correr nuevamente el programa a una potencia mayor de ser necesario.

- 11.2.8. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas (ver que la presión de la bomba que posee el sensor sea menor a 15 psi) para evitar la expulsión de vapores ácidos.
- 11.2.9. Únicamente para el análisis de mercurio y luego de la digestión por microondas, agregar 10 mL de solución permanganato de potasio al 5 % (8.9), cerrar las bombas herméticamente y colocar en un baño de agua a 90 °C durante 15 min.
- 11.2.10. Agregar aproximadamente 20 mL de agua desionizada y pesar la bomba más la tapa con la muestra digerida (P3).



- 11.2.11. Únicamente para el análisis de mercurio, agregar 3 mL de hidroxilamina (8.8), agitar y constatar la ausencia de precipitado correspondiente a óxido de manganeso. Este agregado se realiza previo a la determinación instrumental. El registro del peso P3 se realiza luego de este agregado.
- 11.2.12. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacenada hasta su determinación.
- 11.2.13. Medir la densidad de la muestra digerida, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1,0 mL (IN 407 o equivalente). (d). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (RIN 06).

11.3. Digestión de la Muestra con equipo de microondas Antón Paar Multiwave 3000:

- 11.3.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con una precisión de 1 mg en la ruta de análisis correspondiente (P1).
- 11.3.2. Tarar la balanza y realizar una toma de aproximadamente 0,3 – 1 g de muestra, registrar el peso de muestra (P2).

Nota 8: Ubicar en la posición 1 del rotor (ubicación del sensor de temperatura / presión) aquella muestra que se estima, por su aspecto, posee mayor cantidad de materia orgánica.

- 11.3.3. Agregar, 10 mL de ácido nítrico concentrado 8.3.
- 11.3.4. Correr con cada set de digestión un material de referencia de matriz (8.7)
- 11.3.5. Cerrar las bombas con las tapas sin presionar en exceso. Colocar el sensor de temperatura en la posición uno del rotor, cerrar y hacer un giro opuesto de 45°. Tapar el rotor y ubicarlo en el digestor. Cerrar la puerta del equipo.
- 11.3.6. Encender el equipo con la llave POWER ubicada en la parte delantera del equipo. Presionar F1 para seleccionar el método US EPA SW-3051. Seleccionando nuevamente F1 se presenta el detalle del método. Para editar (modificar) el método seleccionar F2, para iniciar la corrida seleccionar F1.

Nota 9: Los programas están diseñados para rotor completo, en el caso de no contar con muestras a digerir para completar el rotor, cargar las bombas sobrantes con la solución utilizado en la digestión.

- 11.3.7. Correr el programa. Si el programa se corta no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento. Dejar enfriar antes de abrir y referirse al manual del equipo.
- 11.3.8. Dejar enfriar las bombas antes de abrirlas.
- 11.3.9. Únicamente para el análisis de mercurio, agregar 10 mL de solución permanganato de potasio al 5 % (8.9), cerrar las bombas herméticamente y colocar en un baño de agua a 90 °C durante 15 min.
- 11.3.10. Agregar aproximadamente 20 mL de agua desionizada y pesar la bomba con la muestra digerida (P3).
- 11.3.11. Únicamente para el análisis de mercurio, agregar 3 mL de hidroxilamina (8.8), agitar y constatar la ausencia de precipitado correspondiente a óxido de manganeso. Este agregado se realiza previo a la determinación instrumental. El registro del peso P3 se realiza luego de este agregado.
- 11.3.12. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión. De no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico, donde será almacenada hasta su determinación.
- 11.3.13. Medir la densidad de la muestra digerida, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1,0 mL (IN 407 o equivalente). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (RIN 06).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V F (mL) = (P3 - P2 - P1) / d$$

donde:

P1: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

P2: corresponde al peso de muestra, en g.

P3: corresponde al peso del recipiente de digestión, con su tapa más muestra y reactivos luego de la digestión, en g.

d: corresponde a la densidad del digesto en g/mL.

Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** digerir simultáneamente con las muestras, un material de referencia (8.7). Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación. Para el análisis de mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento (2.7).

13.2. **Control de la precisión:** todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento de determinación del metal correspondiente.

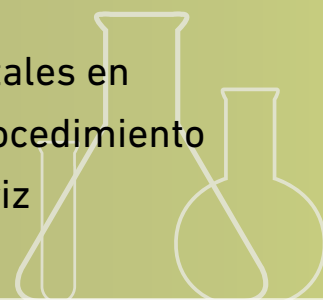
13.3. **Blanco de digestión:** realizar un blanco de reactivos con cada digestión. Para el análisis de mercurio, el control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Kingston. H.M.Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.
- 14.2. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3051. USEPA. Washington, D.C.
- 14.3. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 3030 D Digestion for metals y 3030 K Microwave-assisted digestion pp. 3-7 a 3-9 y 3-11 a 3-13.
- 14.4. EPA, Method 7471B Mercury in Solid or Semisolid Wastes (Manual Cold-Vapor Technique), February 2007, Revision 2.
- 14.5. Manual de instrucciones - Antón Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.
- 14.6. Manual de operaciones. Microwave Sample Preparation, MDS-2100 - CEM CORPORATION. 1994

3276UY

Cálculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz

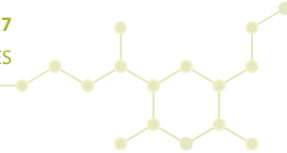


Elaborado - N. Barboza

Modificado - G. Medina

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para calcular la concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivos de uso de balanzas (INE 06, INE 07)
- 2.6. Instructivo de uso de espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104), con autosampler ASC-7000 (IN 105, INE 91)
- 2.7. Instructivo de uso de equipo de digestión CEM (INE 18)
- 2.8. Instructivo de uso de equipo de digestión Alton Para (INE 71)
- 2.9. Instructivo para preparación de agua destilada y uso del destilador (INE 28, INE 36).
- 2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
- 2.11. Ruta de análisis (RIN 06, 07, 16 y/o 20)
- 2.12. Ruta de análisis (RIN 22)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para calcular la concentración de los diferentes metales, en muestras con efecto multiplicativo de matriz, se realiza una curva de fortificación. Los puntos de dicha curva serán las absorbancias de las muestras adicionadas, con diferentes cantidades conocidas de estándar, en función del volumen o cantidad conocida del estándar adicionado.

Nota 1: La presencia de interferencias multiplicativas en una muestra, se determina comparando las pendientes entre una curva de calibración preparada con estándares (sin interferencia), y la curva de la muestra adicionada. Si las pendientes son significativamente diferentes, según ensayo estadístico adecuado (Ver 14.2), se puede concluir que existe efecto matriz.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.
- 4.2. Siempre que fuese necesario el agregado de ácido, realizarlo dentro de la campana.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000, con autosampler ASC-7000
- 7.2. Lámpara de cátodo hueco del metal correspondiente.
- 7.3. Balanza de resolución de 0,001 g (INE06 o INE07).
- 7.4. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 µL y 10 mL).
- 7.5. Tubos de plástico, con tapa, de 10 o 50 mL de capacidad.

Nota 2: Puede utilizarse material de vidrio aforado.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, $d = 1,40 \text{ g/mL}$, Merck 1.00456 o equivalente.
- 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 5 %: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.
- 8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 3: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 4: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Evitar contaminación de la muestra durante la manipulación.
- 9.2. Todo el material de plástico y vidrio utilizado luego de lavado deberá enjuagarse por inmersión en una solución de HNO_3 al 5 % v/v durante al menos 12 horas, o un enjuague único con una solución HNO_3 al 20 % v/v. Luego se enjuagan tres veces con agua desionizada. Este material se mantiene identificado para tal fin.

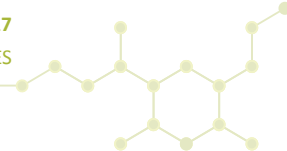
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Pipetear alícuotas preestablecidas de la muestra digerida a medir, según lo observado en el análisis del metal correspondiente. El volumen seleccionado deberá permitir una lectura de absorbancia $< 0,8$ en la muestra fortificada con la mayor concentración. Colocar dichas alícuotas en los recipientes seleccionados para la realización del análisis. Por ejemplo, si se utilizan los tubos de 10 mL: colocar 1,00 mL; 2,00 mL; 3,00 mL o x mL de la muestra problema; exactamente la misma cantidad en todos los puntos de la curva, para que la dilución de la matriz sea la misma en todos los tubos.
- 11.2. Adicionar a cada recipiente un volumen determinado (μL o mL) de una solución estándar del metal correspondiente, comenzando con 0 mL agregados y de manera creciente. Los volúmenes seleccionados deben permitir que en la muestra fortificada con la mayor concentración se observe una lectura de absorbancia legible ($< 0,8 \text{ UA}$). Por ejemplo, si se utilizan los tubos de 10 mL, colocar 0,00 mL, 1,00 mL; 2,00 mL; 3,00 mL del estándar, etc.
- 11.3. Llevar a volumen los recipientes elegidos. Si la dilución se realiza en peso, todos los tubos deben pesar exactamente igual, o de utilizarse material aforado, que la dilución de la matriz afecte a todos los puntos de la curva por igual. El efecto matriz en todos los puntos de la curva debe ser el mismo.
- 11.4. Preparar al menos 6 puntos de la curva de calibración. Leer las absorbancias a la longitud de onda correspondiente para el metal a determinar. Ver procedimiento específico.

Nota 5: Se asume densidad de muestras acuosas de 1 g/mL . En caso contrario calcular como el volumen que descarga una pipeta calibrada, en g, sobre el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL). Corregir la toma de muestra y la toma final.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Graficar Absorbancia en función de los volúmenes de estándar agregado.

12.2. Determinar la ecuación de la curva.

$$A = pV_s + o$$

donde:

A: corresponde a las absorbancias en UA

p: corresponde a la pendiente de la curva

V_s : corresponde al volumen agregado de estándar (mL)

o: corresponde a la ordenada en el origen

Donde la pendiente (p) y la ordenada en el origen (o) vienen dadas por:

$$p = \frac{\epsilon b C_s}{V_t}$$

$$o = \frac{\epsilon b V_o C_A}{V_t}$$

donde:

ϵ : corresponde a la absorptividad molar en [L/(mol cm)]

b: corresponde a la longitud de la cubeta en cm

C_A : corresponde a la concentración de la muestra en (moles/L)

C_s : corresponde a la concentración del estándar en (moles/L)

V_o : corresponde al volumen de muestra usado en (L)

V_t : corresponde al volumen total o final de la dilución (L)

12.3. La abscisa en el origen es el valor V_s cuando la señal de absorbancia es cero, por lo que la abscisa en el origen es o/p y con esto se determina la concentración de la muestra problema.

O sea:

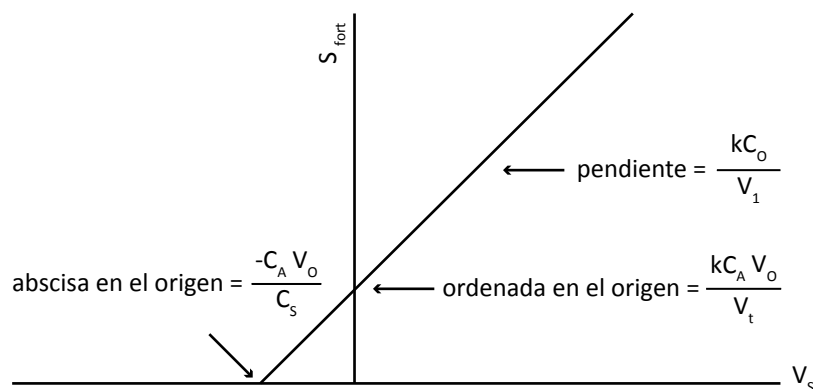
12.4. La abscisa en el origen es el valor V_s cuando la señal de absorbancia es cero, por lo que la abscisa en el origen es o/p y con esto se determina la concentración de la muestra problema.

O sea:

$$\frac{o}{p} = \frac{V_o C_A}{C_s} \quad \text{y} \quad C_A = \frac{o C_s}{p V_o}$$

pudiendo estar la concentración en unidades de mg/L y volumen en L, u otras unidades, siempre que sean compatibles entre sí.

Ejemplos de curvas de calibración para el método de adición de patrón



A) La señal se representa en función del volumen patrón añadido

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de precisión:** el r^2 de la curva, debe de ser mayor o igual a 0,99. De lo contrario repetir la operación.

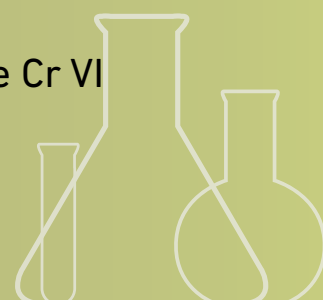
14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. SKOOG/LEARY. Análisis Instrumental, 4ª Edición, 1994. Sección 8D-2, pp 187-189.

14.2. MILLER/MILLER. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª Edición, 2002.

3281UY

Digestión de sólidos para la determinación de Cr VI



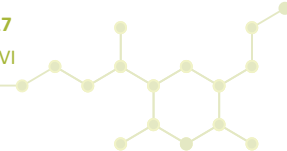
Elaborado - V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la extracción de Cr VI de suelos, lodos, sedimentos, y residuos sólidos para su posterior determinación mediante el procedimiento 3164UY.

2 REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Determinación de pH en suelo y residuos”. (1016UY)
- 2.6. Procedimiento “Determinación de potencial oxido-reductor en matrices sólidas”. (1025UY)
- 2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto (INE06)
- 2.8. Instructivo para preparación de agua destilada (INE36)
- 2.9. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE28)
- 2.10. Instructivo de uso de baño con agitación (INE68)
- 2.11. Instructivo de uso de Analizador de iones (INE10)
- 2.12. Ruta de análisis (RIN 15)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Mediante una digestión alcalina se solubilizan los compuestos de Cr VI, tanto los insolubles como los solubles en agua. El pH debe estar controlado para lo cual se usa un buffer de 0,5 M K_2HPO_4 /0,5 M KH_2PO_4 , se digiere a 90-95 °C durante 1 hora para disolver los compuestos de Cr VI. A este pH se previene la disolución de compuestos de Cr III y su posterior oxidación a Cr VI, mediante el agregado de Mg^{+2} en buffer fosfato.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.
- 4.2. Siempre que fuese necesario el agregado de ácido, realizarlo dentro de la campana.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El potencial redox y el pH de la muestra son determinantes para la existencia de Cr VI en la misma, es así que en muestras con alto poder reductor la fortificación con Cr VI no se recupera pues éste pasa a Cr III. Medir el pH y el potencial redox siguiendo los procedimientos establecidos y usar la gráfica que se anexa para determinar el poder reductor de la muestra.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en bolsas de muestreo de plástico descartable. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar antes de 30 días y luego de digerido analizar antes de 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Baño de agua con agitación (IN309)
- 7.2. Recipientes de digestión: tubos de vidrio con tapa rosca o Erlenmeyers de 250 mL cubiertos con vidrio de reloj
- 7.3. Erlenmeyers de 1 L
- 7.4. Matraces de 1000 y 100 mL.
- 7.5. Balanza de resolución de 0,001 g.
- 7.6. Pipeta calibrada.
- 7.7. Filtros membrana de 0,45 μm de celulosa o policarbonato. Equipo de filtración o jeringas descartables.

- 7.8. Analizador de iones con electrodo de pH y electrodo combinado platino- electrodo de referencia (Orion 96-78).
- 7.9. Agitador magnético.
- 7.10. Tubos de plástico de 50 mL.
- 7.11. Termómetro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada grado 3 (según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desionizada grado 2 (según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.3. Cloruro de magnesio $MgCl_2$ anhidro Nro. CAS 7786-30-3 (se puede usar hexahidrato teniéndolo en cuenta al momento de la toma).
- 8.4. Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4
- 8.5. Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0
- 8.6. Buffer fosfato: disolver 87,09 g de K_2HPO_4 PA y 68,04 g de K_2HPO_4 PA en 1 L de agua desionizada.
- 8.7. Cromato de plomo $PbCrO_4$ Nro. CAS 7758-97-6
- 8.8. Cloruro de sodio NaOH Nro. CAS 1310-73-2
- 8.9. Carbonato de sodio anhidro Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8
- 8.10. Solución de digestión: disolver 20,0 g \pm 0,05 g de NaOH y 30,0 g \pm 0,05 g de Na_2CO_3 anhidro en 1 L de agua 8.2, preparar mensualmente. El pH debe ser mayor a 11,5.
- 8.11. Solución comercial de Cr VI o solución de Cr VI 1000 mg/L preparada de la siguiente manera: disolver 2,829 g de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (Nro. CAS 7778-50-9) secado previamente en estufa a 105 °C con agua desionizada en matraz de 1000 mL.
- 8.12. Para fortificar preparar solución de Cr VI de 100 mg/L realizando una toma de 10 mL de la solución 8.11 y llevando a 100 mL con agua desionizada.
- 8.13. Ácido nítrico 65 % HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2
- 8.14. Acido clorhídrico 37 % HCl Nro. CAS 7647-01-0
- 8.15. Solución para lavado de material: preparar una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua en proporciones 1:2:9. Verificar que el ácido nítrico no tenga color amarillo, ya que dicho color indica la fotoreducción de NO_3^- a NO_2^- , el cual es un agente reductor de Cr VI.

Nota 1: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

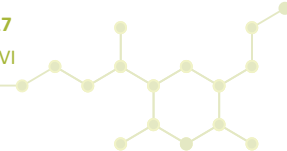
- 9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en una solución la solución 8.15 durante 12 horas. Este material se mantiene identificado para tal fin.
- 9.2. Manejar las muestras en las salas del laboratorio destinadas al tratamiento de muestras y análisis de metales (salas 106 - 107 - 108).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Registrar en RIN 15 la masa del recipiente de digestión con su tapa.
- 11.2. Homogeneizar la muestra y realizar una toma de hasta 2,5 g. Registrar la toma de muestra en la planilla correspondiente. Fortificar una toma de muestra de cada matriz adicionando 1,0 mL de solución 8.12 (Cr VI soluble) o 2 veces la concentración estimada en la muestra (la mayor de estas opciones). A la otra toma, fortificarla adicionando de 10 a 20 mg del reactivo 8.7 (Cr VI insoluble).
- 11.3. Agregar 50 mL \pm 1 mL de solución 8.10, 400 mg de $MgCl_2$ anhidro o 850 mg del hexahidratado, y 0,5 mL de solución 8.6.



- 11.4. Realizar por lo menos un blanco de reactivos.
- 11.5. Cerrar los frascos, agitarlos vigorosamente durante 5 minutos.
- 11.6. Controlar que el agua en el baño esté a 90 – 95 °C. Colocar los frascos de digestión. Encender la agitación. Periódicamente agitarlos además manualmente. Controlar el nivel del agua del baño, en caso de ser necesario agregar agua caliente de manera de mantener la temperatura de la digestión.
- 11.7. Mantener los frascos a la temperatura indicada en el punto anterior durante una hora. Luego dejar enfriar los frascos hasta temperatura ambiente agitando periódicamente y pesarlos. Registrar el peso en la planilla correspondiente.
- 11.8. Medir la densidad de la solución pesando lo que descarga una pipeta calibrada.
- 11.9. Filtrar el digesto. Colocar el filtrado en tubo de plástico.
- 11.10. Mantener los tubos de plástico refrigerados a 4 °C ± 2 °C hasta su medida, momento en el cual se ajusta al pH que indique el procedimiento de determinación.
- 11.11. Si luego de la determinación no se cumple 13.1, medir el pH y el potencial redox de la muestra de acuerdo a lo especificado en el procedimiento 1025UY “Determinación de Potencial Oxido-Reductor en matrices líquidas y sólidas”. y el procedimiento 1016UY “Determinación de pH en suelos y residuos”. Si el valor de potencial (Eh) – pH se encuentra por debajo de la curva del par $\text{HCrO}_4^-/\text{Cr}(\text{OH})_3$ que se anexa (impresa del método 3060 A de la USEPA, pág.14). Esto indica que el suelo es reductor para Cr VI.

Determinación del % de sólidos en la muestra:

- 11.12. Pesar una placa de Petri y registrar el valor en la planilla correspondiente
- 11.13. Colocar aproximadamente 50 gramos de muestra húmeda en la placa. Registrar el peso en la planilla.
- 11.14. Llevar la placa a estufa a 105 °C durante una hora. Dejar enfriar, pesar y registrar el valor.
- 11.15. Repetir los pasos indicados en el punto anterior hasta que la diferencia en las masas sea no mayor a 0,2 – 0,3 mg. En cada ciclo registrar el peso correspondiente.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Cálculo de masa de digesto:

$$M_f (\text{g}) = M_t - M_r - T$$

donde:

M_f (g): corresponde a la masa de digesto

M_d (g): corresponde a la masa final de digestión (medido en punto 11.7)

M_r (g): corresponde a la masa del recipiente de digestión (medida en punto 11.1)

T (g): corresponde a la toma de muestra húmeda (punto 11.2)

- 12.2. Cálculo de factor de corrección por humedad de la muestra:

$$F_h = \frac{M_s - M_p}{M_h - M_p}$$

donde:

F_h: corresponde al factor de corrección por humedad de la muestra, para obtener concentración en de Cr VI en mg/kg de muestra en base seca.

M_p: corresponde a la masa de placa de Petri (punto 11.12)

M_s: corresponde a la masa de placa + muestra luego del secado (11.12)

M_h: corresponde a la masa de placa + muestra antes del secado (11.13)

12.3. Cálculo de % de Recuperación para el caso de fortificar con Cr VI soluble (dicromato de potasio):

$$\% R = 100 \times (C_{mf} \times (m_{m1} + m_{fort}) - ((C_m \times m_{m1})/m_{fort})) \times 1E-6$$

donde:

C_{mf} : corresponde a la concentración de CrVI en el sólido fortificado (mg/kg)

m_{m1} : corresponde a la masa de muestra sólida utilizada en la digestión de la muestra fortificada (g)

m_{fort} : Concentración del estándar de fortificación (mg/L) x Volumen de estándar (L)

C_m : corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido sin fortificar (mg/kg)

12.4. Cálculo de % Recuperación para el caso de fortificar con cromato de plomo:

$$\% R = 100 \times (C_{mf} \times (m_{m1} + m_{fort}) - ((C_m \times m_{m1})/(m_{fort} \times PA/PM))) \times 1E-6$$

donde:

C_{mf} : corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido fortificado (mg/kg)

m_{m1} : corresponde a la masa de muestra sólida utilizada en la digestión de la muestra fortificada (g)

m_{fort} : corresponde a la masa de $PbCrO_4$ (g)

C_m : corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido sin fortificar (mg/kg)

PA: corresponde al peso atómico de Cr VI (51,996 g/mol)

PM: corresponde al peso molecular $PbCrO_4$ (323,182 g/mol)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de recuperación:** realizar al menos una fortificación en cada matriz. Control de recuperación con $PbCrO_4$ o $K_2Cr_2O_7$; la recuperación debe estar en el rango de 75 - 125 %.

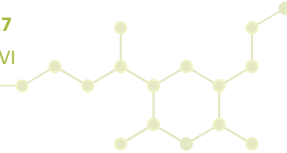
13.2. **Material de referencia:** en caso de contar con un material de referencia, la recuperación del valor de referencia debe estar entre el rango de 80 - 120 %.

13.3. **Control de la precisión:** realizar un duplicado en cada matriz. Verificar que la dispersión de los rangos normalizados sea menor al 20 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

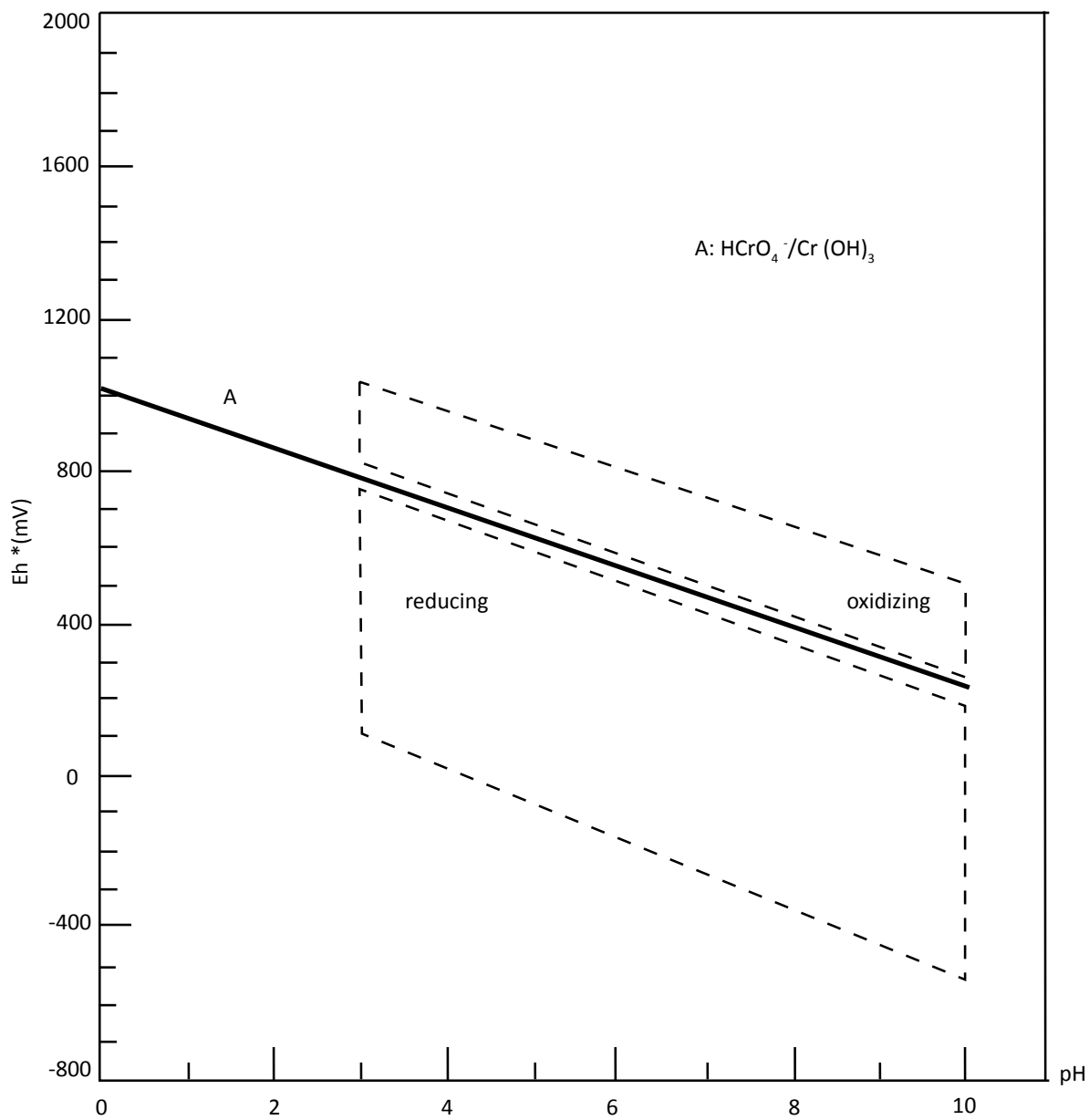
14.1. USEPA Method 3060A "Alkaline digestion for hexavalent chromium" SW 846, 1996.

14.2. USEPA Method 9045D "Soil and Waste pH" SW 846, 2004.



Anexo: Diagrama Potencial Redox/pH

The dashed lines define Eh-pH commonly in soils and sediments.



*Note the Eh values plotted on this diagram are corrected for the reference electrode voltage: 244 mV units must be added if a combination platinum electrode is used.



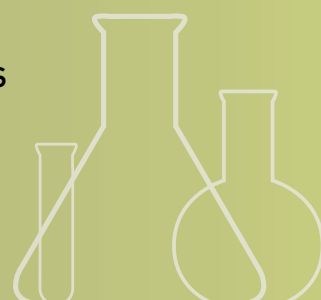
SECCIÓN 4





4003UY

Determinación de Amonio en aguas naturales
y efluentes líquidos



Método potenciométrico

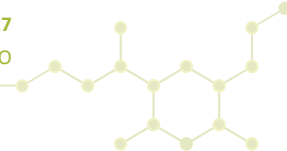
Elaborado - G. Medina

Modificado - N. Barboza

Revisado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de amonio en aguas naturales y efluentes líquidos. Se puede determinar amonio en concentraciones entre 0,05 a 1400 mg $\text{NH}_4^+ \text{ N /L}$. El límite de detección es de 0,01 mg $\text{NH}_4^+ \text{ N /L}$

Altas concentraciones de iones disueltos afectan la lectura. No es aplicable a muestras salinas.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 98).
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16)
- 2.7. Ruta de análisis código (RFQ03).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se considera amonio disuelto tanto al amoníaco libre ($\text{NH}_{3(\text{aq})}$) como a los iones amonio (NH_4^+) presentes en solución.
- 3.2. El electrodo selectivo de amonio está constituido por una membrana hidrofóbica, permeable a los gases, que separa la solución interna del mismo, constituida de cloruro de amonio, de la solución a medir. El amonio disuelto se convierte en amoníaco al aumentar a 11 el pH de la muestra. El amoníaco difunde a través de la membrana hasta igualar su presión parcial a ambos lados de la misma, cambiando reversiblemente el pH de la solución interna. Este cambio es detectado con un electrodo de pH inmerso dentro del cuerpo electrodo y es medido contra un potencial de referencia interno.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. En particular, la solución reguladora de fuerza iónica ISA que contiene una elevada concentración de hidróxido de sodio (NaOH), es muy corrosiva al contacto con la piel y ojos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Las aminas volátiles dan interferencia positiva.
- 5.2. Muestras no acuosas o que contengan surfactantes que puedan traspasar la membrana perjudicarán la medida. En dichas muestras el electrodo debe ser suspendido por encima de la solución problema, al recipiente de medida se le debe colocar una tapa con un orificio, de forma que el electrodo traspase el mismo sellándolo, evitando así, pérdidas del amoníaco a determinar. La curva de calibración deberá realizarse en las mismas condiciones.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de al menos 250 mL de capacidad. Refrigerar a $\leq 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0 \text{ }^\circ\text{C}$). Las muestras deben ser filtradas por filtro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 6.2. Se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo. De no ser posible, ajustar a $\text{pH} < 2$ con ácido sulfúrico concentrado y analizar dentro de los 7 días de recogida la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).
- 7.2. Electrodo selectivo de amonio (Orion 9512), con su solución de relleno, según la muestra a analizar: para análisis de aguas naturales solución de relleno Orion 951202 diluida 10 veces, para análisis de efluentes líquidos solución de relleno Orion 951202.
- 7.3. Agitador magnético.
- 7.4. Barras magnéticas recubiertas de teflón.
- 7.5. Vasos de Bohemia de 250 mL.
- 7.6. Matraz aforado de 500 mL.
- 7.7. Erlenmeyer de 125, 500 y 1000 mL.
- 7.8. Probeta de 100 mL.
- 7.9. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 μL y 1-10 mL).
- 7.10. Tubos de 10 mL de plástico descartables.
- 7.11. Balanza de resolución 0,01 g (tipo ADN HF2000G o similar).
- 7.12. Balanza de resolución 0,0001 g (tipo Precisa 205 o similar).

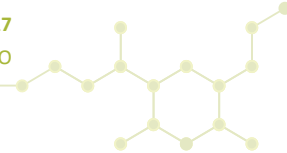
8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución reguladora de fuerza iónica, ISA: pesar 200 g de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), colocarlos en un Erlenmeyer de 1000 mL, agregar 800 mL de agua destilada, agitar hasta disolver y dejar enfriar. Pesar 15,2 g de ácido etilendiamino disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 6381-92-6), agregarlos a la solución sódica, agitar hasta disolver. En un Erlenmeyer de 125 mL disolver 0,05 g de timolftaleína ($\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_4$ Nro. CAS 125-20-2) en 100 mL de metanol (CH_3OH Nro. CAS 67-56-1) y agregar a la solución anterior, llevar a 1000 mL con agua destilada.
- 8.3. Solución stock de amonio, 1000 mg $\text{NH}_4^+ \text{N}$ /L: pesar 1,9095 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) anhidro, previamente secado en estufa a 105 °C hasta peso constante, colocarlos en un matraz aforado de 500 mL, agregar 250 mL de agua destilada, agitar hasta disolución y enrasar. Se puede preparar un volumen menor manteniendo las proporciones. Alternativamente preparar en Erlenmeyer al peso, asumiendo densidad de solución igual a 1 g /mL.
- 8.4. Solución estándar de amonio, 10 mg $\text{NH}_4^+ \text{N}$ /L: tomar 100 μL de la solución stock de amonio y llevar a 10 mL con agua destilada en tubo de plástico descartable. Se prepara al peso asumiendo densidad de solución igual a 1 g /mL.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El electrodo responde lentamente por debajo de concentraciones de amonio de 1 mg $\text{NH}_4^+ \text{N}$ /L, por lo cual para analizar muestras con bajo contenido de amonio se debe diluir la solución de relleno del electrodo 10 veces, lo que disminuye el tiempo de estabilización.
- 9.2. Tanto en la preparación de la curva de calibración, como en la determinación de la muestra problema la solución reguladora de fuerza iónica ISA, debe ser adicionada inmediatamente antes de la medida. Las pérdidas de amonio que se obtienen al agitar 100 mL de muestra básica, en un vaso de 100 mL, a temperatura ambiente, es de aproximadamente 50 % en 6 horas.
- 9.3. Trabajar con la misma velocidad de agitación y a la misma temperatura durante la calibración y la medida de las muestras problema. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 9.4. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

- 10.1. Realizarlo siempre que sea necesario, electrodo en desuso durante tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.
- 10.2. En Erlenmeyer de 150 mL colocar 100 mL agua destilada libre de amoníaco. Agregar 1,00 mL de la solución stock de 1000 ppm y agitar suavemente. Colocar el electrodo en la muestra y agregar 2 mL de la solución ISA. Registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida, la estabilización puede requerir hasta 5 minutos.
- 10.3. Agregar a la solución anterior 10,0 mL de la solución stock de 1000 ppm, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.
- 10.4. Si la temperatura de medida está entre $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la diferencia de voltaje (slope) entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de - 54 a - 60 mV. En caso contrario repetir la operación; si el error persiste referirse al "Manual de instrucciones del electrodo".

Nota 2: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 ppm de NH_4^+ N/L.

Curva de calibración:

- 10.5. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución stock o de la solución estándar de amonio a 100 mL de agua destilada. Los estándares de la curva de calibración deben cubrir la concentración esperada de la muestra. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar el rango de la misma.
- 10.6. Pesar 100 mL de agua en un Erlenmeyer de 150 mL, (Pi).
- 10.7. Agregar solución reguladora de fuerza iónica ISA, de forma que el pH de la solución esté en el rango de 11 a 14, generalmente 2,00 mL es suficiente. En dicho rango de pH, el color de la solución resultante debe ser azul. Sumergir el electrodo en la solución y mezclar mediante agitación magnética.
- 10.8. Para el análisis de aguas naturales y muestras de contenido de amonio menor a 1 mg NH_4^+ N/L agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de amonio de 10 mg NH_4^+ N /L, según el fin perseguido. Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Registrar el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 10.9. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes de concentración exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como el potencial obtenido.
- 10.10. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.
- 10.11. Para el análisis de efluentes líquidos, agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de amonio de 1000 mg NH_4^+ N/L, según el fin perseguido. Generalmente se comienza con 500 μL . Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 10.12. Proseguir según los puntos 10.9 y 10.10.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Colocar un Erlenmeyer sobre la balanza y tarar la misma. Agregar aproximadamente 100 mL de muestra, o una toma apropiada de la misma y llevar a 100 mL con agua destilada. Registrar la toma de muestra (Pm) y el volumen final (Vf), agua + muestra, en caso de ser necesaria una dilución.
- 11.2. Agregar 2,00 mL de solución reguladora de fuerza iónica o la cantidad necesaria para obtener un pH mayor a 11 (la coloración de la solución debe ser azul). Registrar la cantidad de ISA adicionada. Agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

Nota 3: En caso de haber acidificado la muestra, neutralizarla con NaOH previo al análisis, registrando el factor de dilución.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La concentración de amonio para cada agregado de estándar se calcula según:

$$\text{Amonio, mg N /L} = \frac{V_{\text{agregado}} \times C_{\text{estándar}}}{(V_{\text{agregado}} + V_{\text{inicial}} + I)}$$

donde:

V_{agregado} : corresponde a la suma de los volúmenes agregados de estándar en mL.

V_{inicial} : corresponde a P_i en g (se considera la densidad de la solución acuosa 1,0 g /mL)

$C_{\text{estándar}}$: corresponde a la concentración del estándar que se adiciona en mg/L.

I: corresponde a los mililitros de ISA agregados a la curva.

Nota 4: La curva de calibración se puede realizar preparando los estándares por separado y midiendo el voltaje para cada uno de los mismos.

12.2. Graficar el logaritmo decimal de la concentración de amonio expresada como nitrógeno, en función al opuesto del potencial registrado en mV (-mV).

12.3. Para concentraciones mayores a 1 mg $\text{NH}_4^+ \text{N}$ /L la curva de calibración del logaritmo decimal de la concentración de amonio en función del opuesto del potencial es una recta, en concentraciones menores a 1 mg $\text{NH}_4^+ \text{N}$ /L la curva de mejor ajuste es una cuadrática:

$$\text{curva de calibración lineal: } \log (\text{mg } \text{NH}_4^+ \text{N} /\text{L}) = a \times (-\text{mV}) + b$$

$$\text{curva de calibración cuadrática: } \log (\text{mg } \text{NH}_4^+ \text{N} /\text{L}) = a \times (-\text{mV})^2 + b \times (-\text{mV}) + c$$

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de ajuste de las curvas.

12.4. La concentración de amonio en aguas naturales o en muestras de concentraciones menores a 1 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ /L se calcula:

$$\text{Amonio, mg } \text{NH}_4^+ \text{N} /\text{L} = 10\text{EXP}[(a \times (-\text{mV})^2 + b \times (-\text{mV}) + c) \times (V_f)/(V_m)]$$

12.5. La concentración de amonio en el rango lineal se calcula:

$$\text{Amonio, mg } \text{NH}_4\text{-N} /\text{L} = 10\text{EXP} [a \times (-\text{mV}) + b] \times (V_f/V_m)$$

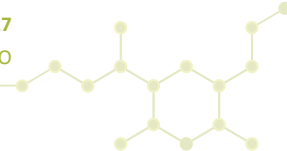
donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra.

V_f : corresponde al volumen final dado por peso de la muestra (asumiendo densidad igual a 1 g/mL) + agua (si fuese necesaria una dilución) + volumen de ISA agregado.

V_m : corresponde al peso de muestra en g, se asume densidad igual a 1 g /mL.

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva de calibración respectiva.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** analizar la solución de “Control de Amonio” (elaborada por el sector Control de Calidad) simultáneamente con las muestras, realizar una toma de la solución control de forma tal que se ajuste a la curva de calibración a elaborar. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, obtenidos a partir del gráfico de control. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por serie de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21th edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 NH₃- D Ammonia Selective Electrode Method pp. 4-111 a 4-112.
- 14.2. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual ammonia electrode. 2003.



4004UY

Determinación de amonio en aguas y efluentes



Flow Injection Analysis (FIA)

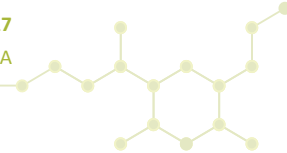
Elaborado - E. Broggi

Modificado - No aplica

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de amonio en aguas naturales, salobres o salinas y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de (0,013 – 250) mg NH_4^+ -N/L y el rango lineal (0,013 – 1,0) mg NH_4^+ -N/L. El límite de detección es de 0,0044 mg NH_4^+ - N/L

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 78)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B, INE 06)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 28)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método se basa en la reacción de Berthelot. El amonio reacciona con el fenol alcalino e hipoclorito de sodio para formar azul de indofenol. El nitroprusiato de sodio es añadido para aumentar la sensibilidad. La absorbancia del producto de reacción es medida a 630 nm y es directamente proporcional a la concentración de amonio original en las muestras. El método no ha sido validado considerando la posible necesidad de destilación de la muestra por lo cual la misma no aplica para este procedimiento.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requiere túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Los siguientes reactivos tienen potencial de ser altamente tóxicos o peligrosos: fenol y nitroprusiato de sodio.

Nota 1: para evitar el olor del fenol en el ambiente donde se encuentra el FIAS se recomienda tapar con Parafilm el recipiente del reactivo de fenolato de sodio y el de descarte.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los iones calcio y magnesio pueden precipitar si se encuentran en altas concentraciones. Se añade EDTA en línea a la muestra para prevenir la precipitación.
- 5.2. El color, la turbidez y ciertas especies orgánicas pueden causar interferencias. La turbidez es removida por filtración con filtro de 0,45 μm de tamaño de poro. El color de la muestra puede ser corregido corriendo las muestras en el equipo sin desarrollo de color o por dilución de la muestra.
- 5.3. Pueden existir interferencias por contaminación del agua desionizada, los reactivos, material de vidrio u otros materiales utilizados en la preparación de las muestras por lo cual se debe prestar mucha importancia a la limpieza de todo el material.
- 5.4. Eliminar cualquier diferencia marcada en el pH de las muestras dado que la intensidad del color es dependiente del mismo. En general esto no representa problemas ya que los efluentes industriales son diluidos en un factor de 200 y las aguas naturales no presentan grandes variaciones del pH.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar al menos 250 mL de muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Las muestras deben ser filtradas por filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.
- 6.1. Realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.
- 6.2. De no ser posible congelar la muestra a -20°C y analizarla antes de los 28 días.

Nota 2: la preservación de las muestras por acidificación no es aplicable a esta metodología de la forma en que está presentada.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Balanza de resolución 0,001 g.
- 7.2. Balanza de resolución de 0,01 g.
- 7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL y (100 – 1000) μ L.
- 7.4. Matraces aforados de 100 mL.
- 7.5. Matraces Erlenmeyer de 150 ó 250 mL.
- 7.6. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de manifold para la determinación de amonio (LCHAT QuickChem 8500 o similar)
- 7.7. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL o 1000 mL.
- 7.8. Bomba de vacío.
- 7.9. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

Nota 3: Es recomendable desgasear los reactivos que se utilizan en el sistema de inyección en flujo (excepto los estándares y controles) para prevenir formación de burbujas en el sistema. Se detalla la preparación de los reactivos para un batch de 10 muestras aproximadamente.

- 8.1. **Fenol:** (C_6H_5OH Nro. CAS 108-95-2) en una matraz Erlenmeyer apropiado verter 88,8 g de agua desionizada y agregar 8,3 g de fenol cristalino. Mientras se agita con agitador magnético agregar 3,2 g de hidróxido de sodio. Enfriar la solución y agitar circularmente para homogeneizar. **NO DESGASEAR ESTE REACTIVO.**
- 8.2. **Hipoclorito de sodio:** (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9) en un matraz apropiado verter 25 g de hipoclorito de sodio comercial 100 g de cloro activo por litro, y agregar 75 g de agua desionizada.
- 8.3. **Nitroprusiato de sodio:** [$Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$ Nro. CAS 13755-38-9] en un matraz apropiado pesar 0,35 g de nitroprusiato de sodio y agregar 100 g de agua desionizada.
- 8.4. **Hidróxido de sodio 1M:** (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) en un matraz aforado de 100 mL. agregar 4,00 g de hidróxido de sodio sólido y 75 mL de agua desionizada. Disolver, enfriar y completar los 100 mL con agua desionizada.
- 8.5. **Buffer de agente quelante:** en un matraz aforado de 100 mL pesar 5,00 g de EDTA disódico ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) y agregar 70 mL de agua desionizada y 22,5 mL de solución de hidróxido de sodio 1 M. Disolver con agitador magnético y completar los 100 mL con agua desionizada.
- 8.6. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.7. Solución estándar de amonio. Solución de referencia certificada de 100 mg N/L.
- 8.8. Solución control de amonio de 200 mg N/L. Preparada a partir de cloruro de amonio solución de referencia certificada independiente de la solución estándar de amonio.

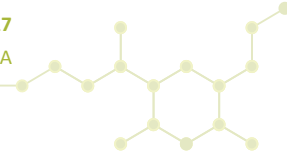
Nota 4: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar una serie de estándares de acuerdo al siguiente cuadro y con una resolución de 0,001 g:



| Conc. Std. (mg NH ₄ ⁺ N/L) | masa std (g) | masa fin (g) | Conc. aprox. fin (mg NH ₄ ⁺ N/L) |
|---|--------------|--------------|---|
| 100 | 1,0 | 100 | 1,0 |
| 1,00 | 25 | 50 | 0,50 |
| 1,00 | 5,0 | 50 | 0,10 |
| 1,00 | 2,5 | 50 | 0,050 |
| 1,00 | 1,25 | 50 | 0,025 |
| 1,00 | 0,65 | 50 | 0,013 |
| 200 | 0,10 | 100 | 0,20 |

Nota 5: se asume una densidad de 1 g/mL.

Nota 6: el estándar sombreado corresponde a la solución control para el chequeo de la curva de calibración

- 10.2. Encender el equipo de inyección en flujo.
- 10.3. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.
- 10.4. Verificar que el calentador del manifold esté seteado a 60 °C y que comenzó a elevar la temperatura. Nunca trabajar con el calentador encendido sin hacer pasar líquido a través del mismo.
- 10.5. Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar a la temperatura de trabajo por unos 10 minutos.
- 10.6. Colocar un blanco de agua desionizada, los estándares de la curva de calibración y el control en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua desionizada y luego del estándar de menor a mayor concentración.
- 10.7. Verificar en el computador, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Colocar una porción de cada muestra (filtrada) a analizar en los tubos del rack del autosampler (enjuagar previamente cada tubo con la muestra a ser contenida en el mismo)
- 11.2. Las muestras de aguas naturales se analizan en forma directa (sin dilución).
- 11.3. Para efluentes cargados se aconseja realizar una dilución de unas 200 veces aproximadamente. Realizar y registrar la masa de la muestra y la masa final de la dilución.
- 11.4. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.
- 11.5. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.
- 11.6. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración Área en función de la Concentración y calcula la concentración de los controles y las muestras.
- 12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.
- 12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.
- 12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

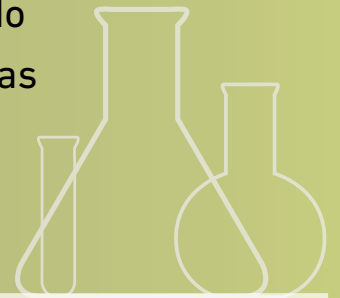
- 13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.1. Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración, cada 5 muestras de efluentes ó 10 muestras de aguas, y al final de toda la secuencia. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes. Si el resultado del control de la curva está fuera de control estadístico, se debe revisar el procedimiento, repetir la preparación del control o de la curva de calibración. Si algún resultado de los siguientes controles está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.2. Adicionalmente, una vez obtenida la función de calibración, interpolar el área del pico del estándar de 0,013 mg/L y obtener la concentración resultante. La concentración obtenida no puede apartarse en más de un 10 % del valor real. En caso contrario la curva de calibración deberá construirse a partir del estándar de 0,020 mg/L.
- 13.3. **Control de la precisión:** Realizar una inyección por duplicado de una de cada cinco muestras de aguas y una de tres muestras de efluentes. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico en el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico
- 13.4. **Porcentaje de recuperación:** en un recipiente adecuado pesar 50 g de la muestra a ser analizada y fortificar con 200 μ L, tomados con pipeta de (100 – 1000) μ L calibrada, de una dilución de la solución control de 20 mg N/L. Si los efluentes fueron diluidos se debe fortificar la dilución y no la muestra original. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentren bajo control estadístico en el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. LCHAT, QuikChem® Method 10-107-06-1-J, Determination of ammonia by flow injection analysis.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-NH₃ H Flow Injection Analysis pp. 4-118 a 4-119.

4012UY

Determinación de Fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales



Método espectrofotométrico

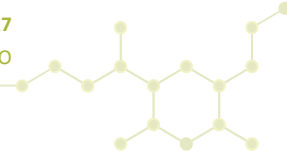
Elaborado - A. De Nigris

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Se denomina fósforo reactivo al fósforo que reacciona al test colorimétrico sin digestión preliminar. La mayor parte del fósforo reactivo es medido como ortofosfato, existiendo una pequeña porción de fosfatos condensados, los cuales usualmente se encuentran presentes de forma hidrolizada y por tanto, no están disponibles para la determinación.
- 1.2. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Es aplicable también a aguas salobres o salinas.
- 1.3. Para la determinación del fósforo reactivo disuelto, se filtra la muestra a través de membrana 0,45 μm de tamaño de poro.
- 1.4. Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo reactivo en un rango de 18 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$ a 500 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$. El límite de detección es de 3,6 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de Mantenimiento y Control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 93, INE 94)
- 2.6. Instructivo de uso balanza de resolución 0,0001 g (INE 16A, INE 16B)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 38)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 11)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo reactivo, que se mide en un espectrofotómetro a 880 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. En particular el tartrato de antimonio y potasio es sumamente tóxico por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dicho reactivo.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso. Concentraciones tan bajas como 0,1 mg As/L interfieren con la determinación de fosfatos.
- 5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 ppm y entre 10 % y 15 % más bajos en concentraciones de 10 ppm.
- 5.3. El sulfuro de sodio (Na_2S) y el ion silicato no interfieren en la determinación si se encuentran en concentraciones de 1,0 mg/L y 10 mg/L respectivamente.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra típica es de 200 mL. Recolectar en frasco de vidrio, lavado sin detergente, enjuagado previamente con ácido clorhídrico (HCl) 1+1.
- 6.2. Mantener la muestra refrigerada a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$).
- 6.3. Filtrar la muestra (si se desea analizar el contenido soluble). Realizar la determinación antes de las 48 h, de lo

contrario, y congelar a temperatura ≤ -10 °C en frasco de vidrio enjuagado con HCl 1+1 en caliente. Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

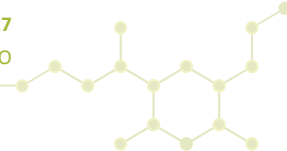
- 7.1. Espectrofotómetro, longitud de onda 880 nm, con paso óptico de 2,5 cm o mayor.
- 7.2. Celda: Tubos de 25 ó 50 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro con tapa
- 7.3. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 100 a 1000 μ L
- 7.7. Matraz aforado de 1000 mL.
- 7.8. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 500 mL
- 7.9. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 1000 mL.
- 7.10. Bomba de vacío
- 7.11. Filtros de acetato de celulosa de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de diámetro de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución acuosa de fenoftaleína. Disolver 0,5 g de fenoftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de agua desionizada. Solución estable por 6 meses.
- 8.3. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9), 5 N: diluir 70 mL de H_2SO_4 conc. en 430 mL de agua 8.1.
- 8.4. Reactivo de molibdato de amonio: disolver 20 g de molibdato de amonio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] en 500 mL de agua 8.1. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.
- 8.5. Solución de ácido ascórbico 0,1 M: disolver 1,76 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) en 100 mL de agua 8.1. La solución es estable por una semana a ≤ 6 °C (>0 °C), almacenar en recipiente de vidrio color ámbar.
- 8.6. Solución stock de fosfato, 50 mg P/L: disolver en agua 8.1 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) anhidro y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.
- 8.7. Solución de trabajo, 1 mg P/L. Diluir la solución stock de fosfato 50 veces: 10,00 mL en 500 mL, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso con precisión de 0,01 g. Esta solución es estable por 1 mes.
- 8.8. Solución de tartrato de antimonio y potasio: disolver 1,3715 g de $[K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] ó 1,47 g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 3 H_2O$ en 400 mL de agua 8.1 en un matraz de 500 mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.
- 8.9. Reactivo combinado: Preparar inmediatamente antes del desarrollo de color, 100 mL de reactivo combinado (o la cantidad que se vaya a necesitar), mezclando en el orden dado los siguientes reactivos:
 - 50 mL de H_2SO_4 5 N
 - 5 mL de tartrato de antimonio y potasio
 - 15 mL de molibdato de amonio
 - 30 mL de ácido ascórbico

Importante: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente previo al mezclado. Mezclar después de la adición de cada reactivo. Si la solución presenta turbidez, agitar y dejar reposar por unos minutos hasta que la turbidez desaparezca. En caso que la turbidez no desaparezca, debe reiterarse la preparación de este reactivo. El mismo es estable por 4 horas.
- 8.10. HCl 1+1: se preparara diluyendo HCl Nro. CAS 7647-01-0 comercial, al medio con agua 8.1.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material utilizado debe ser de vidrio.
- 9.2. Todo el material de vidrio, tanto frascos de muestreo como de análisis, deben tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 caliente y finalmente tres enjuagues con agua desionizada.
- 9.3. Todo el material de vidrio utilizado inclusive el de almacenamiento de reactivos deben tener el tratamiento anterior.
- 9.4. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. A partir de la solución de trabajo 1 mg P/L o material de referencia certificado, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados deben ser tomados con pipeta automática de volumen variable 1-10 mL, material aforado o por pesada con precisión 0,01 g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL

| Volumen de Solución Trabajo | Volumen final | Concentración en $\mu\text{g P/L}$ |
|-----------------------------|---------------|------------------------------------|
| 0,00 | 20,00 | 0 |
| 0,20 | 20,00 | 10 |
| 1,00 | 20,00 | 50 |
| 2,00 | 20,00 | 100 |
| 4,00 | 20,00 | 200 |
| 10,00 | 20,00 | 500 |

- 10.2. Medir un punto de solución control junto con la curva de calibración.
- 10.3. Realizar el ajuste de cero del instrumento con una celda de lectura conteniendo agua desionizada.
- 10.4. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado. A esta medida le llamaremos Abs_{Blanco} .
- 10.5. Agregar una gota de solución de fenoftaleína. Si la solución vira a color rosado, agregar H_2SO_4 5 N en gotas hasta que vire a incoloro. Tomar en cuenta la dilución que estos agregados genera al estándar.
- 10.6. Agregar 3,2 mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.
- 10.7. Medir la absorbancia de las soluciones a 880 nm de longitud de onda, entre 10 y 30 minutos luego de agregado del reactivo combinado. A esta medida le llamaremos Abs_{estandar} .
- 10.8. Realizar la gráfica de $(Abs_{\text{estandar}} - Abs_{\text{Blanco}})$ en función de concentración del estándar en $\mu\text{g P/L}$.

11 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Preparación de los filtros.
 - 11.1.1. Utilizar filtros de membrana comerciales preparados, en caso contrario, deben ser lavados antes de ser usados, ya que podrían contribuir con cantidades significativas de fósforo a muestras de bajas concentraciones.
 - 11.1.2. Existen dos formas de preparación de filtros:
 - a) empapar 50 filtros en 2 L de agua desionizada durante 1 hora, luego cambiar el agua y dejarlos por tres horas más.
 - b) empapar 50 filtros en 2 L de agua desionizada durante 24 horas.
- 11.2. Filtrar la muestra en caso de determinar fósforo reactivo disuelto.
- 11.3. Pipetear en los tubos o celda de lectura, 20,00 mL de la muestra previamente filtrada o una alícuota de la misma diluida a 20,00 mL. Realizar la toma con pipetas aforadas ó en peso con precisión 0,01 g. Agregar una gota de solución de fenoftaleína. Si la muestra vira a color rosado, agregar H_2SO_4 5 N en gotas hasta que vire a incoloro. Tomar en cuenta la dilución que estos agregados genera a la muestra.
- 11.4. Medir la absorbancia a 880 nm, previo agregado del reactivo combinado. Esta medida corresponde a la Abs_{cero} .

- 11.5. Agregar 3,2 mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.
- 11.6. Medir la absorbancia a 880 nm, (corresponde a Abs_{muestra}), entre 10 y no más de 30 minutos luego del agregado del reactivo combinado.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs}_{\text{estándar}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) = a \times (\mu\text{g P/L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la recta respectivamente

12.2. La concentración de fosfato en la muestra se calcula según:

$$\text{Fosfato, } \mu\text{g P/L} = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{cero}} - b) \times \text{FD}}{a}$$

donde:

FD: (factor de dilución de la muestra) = Volumen final / Toma de la muestra

Abs_{cero}: corresponde a la absorbancia de la muestra previo al agregado del reactivo combinado, si no se lee la Abs_{cero} sustituir esta por la Abs_{blanco}.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** tomar la cantidad necesaria de la solución de "Control de Fósforo" (elaborada por el Responsable de Calidad o quien indique) en un tubo o celda de lectura, realizar la toma de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Comparar el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición del análisis. (Según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Recuperación de la fortificación:** fortificar todas las muestras de aguas residuales y 1 de cada 5 de las muestras de agua natural con 100 µL de la solución control de 50 mg P/L. Se compara el resultado con su valor original y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.3. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico). La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos. En caso de desvío, se deberá evaluar la repetición del análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 4500-P A Phosphorus Introduction, 4500-P B Sample preparation y 4500-P E Ascorbic Acid Method pp 4-148 a 4-152 y 4-155 a 4-157.

4013UY

Determinación de fósforo total en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales



Método espectrofotométrico

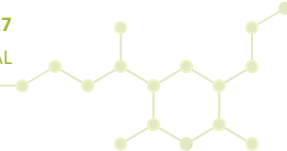
Elaborado - P. Simone

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Se denomina fósforo total a todo el fósforo presente en una muestra, que corresponden a ortofosfato, fosfatos condensados y fosfatos unidos a materia orgánica.

Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo total en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Es aplicable también en aguas salobres o salinas.

Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo total en un rango lineal de 0,03 a 0,80 mg P/L. El límite de detección es de 0,01 mg P/L.

Es posible determinar niveles mayores de fósforo por dilución de la muestra, debiendo determinar previamente el rango de trabajo.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso autoclave (INE 86)
- 2.6. Instructivos de uso balanzas (INE 16 A, INE 16 B)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 12)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El fósforo en agua puede encontrarse en combinación con materia orgánica, la determinación del fósforo total implica la oxidación de toda la materia orgánica presente a efectos de asegurarse que todo el fósforo se encuentre finalmente bajo forma de ortofosfato. Luego de la digestión, el fósforo se determina como fósforo reactivo por el método colorimétrico con ácido ascórbico.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. En particular, el persulfato de amonio, y el tartrato de antimonio y potasio son tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.
- 4.4. El ácido sulfúrico está diluido al 30 % por lo tanto es corrosivo y debe tratarse con las precauciones del caso.

Nota 1: Al preparar el ácido sulfúrico diluido, verter el mismo sobre el agua desionizada y no al contrario, debido a que produce una reacción exotérmica.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso, en concentraciones por encima de 0,1 mg As/L.
- 5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 mg/L y entre 10 % y 15 % más bajo a concentraciones de 10 mg/L.
- 5.3. Na_2S no interfiere con la determinación si se encuentra en concentraciones menores que 1,0 mg/L.
- 5.4. El ión silicato interfiere si está presente en concentraciones mayores que 10 mg/L.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de vidrio, lavado sin detergente y enjuagado en caliente con HCl 1+1. El volumen típico de la muestra es de 300 mL.
- 6.2. Mantener la muestra refrigerada a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$).

- 6.3. Filtrar la muestra (si se desea analizar el contenido soluble). Realizar la digestión antes de las 48 h de extraída la muestra y la determinación de color antes de siete días.
- 6.4. En caso de no poder determinarse en los tiempos mencionados, la muestra puede ser preservada acidificando con H_2SO_4 o HCl a $\text{pH} < 2$ y refrigerada a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$), o congelar sin aditivos, en ambos casos durante un máximo de 28 días.

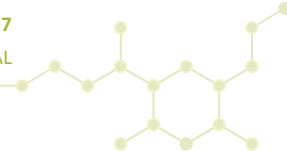
7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Autoclave: con posibilidad de desarrollar presiones entre 98 y 137 kPa (1 atm es igual a 101,325 kPa) (Fanem 415/4 o similar)
- 7.2. Espectrofotómetro, longitud de onda 880 nm, con paso óptico de 2,5 cm (Spectronic 20 Genesys o similar).
- 7.3. Celda: tubos o celdas de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro.
- 7.4. Balanza de resolución 0,01 g (AND HF-2000G o similar).
- 7.5. Balanza de resolución 0,001 g (Precisa 205Ao similar).
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL.
- 7.7. Matraz aforado de 1000 mL y Erlenmeyers de 250 y 500 mL.
- 7.8. Frascos de digestión (Schott o similar), de vidrio graduado de 100, 250 o 500 mL, provistos de tapón plástico resistente al calor.

8. REACTIVOS

Nota 2: Los reactivos preparados deben almacenarse en recipientes de vidrio, provistos de etiquetas con el nombre del reactivo, fecha de preparación y vencimiento así como también las iniciales del analista.

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696)
- 8.2. Solución acuosa de fenoftaleína: disolver 0,5 g de fenoftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de agua desionizada. Solución estable por 6 meses.
- 8.3. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) al 30 %: agregar lentamente 300 mL de H_2SO_4 a 600 mL de agua 8.1, y llevar a un litro.
- 8.4. Reactivo sólido de persulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Nro. CAS 7727-54-0) o persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ Nro. CAS 7727-21-1)
- 8.5. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 N: disolver 20 g de NaOH en 500 mL de agua 8.1.
- 8.6. Acido sulfúrico (H_2SO_4), 5 N: en 430 mL de agua desionizada verter 70 mL de H_2SO_4 conc.
- 8.7. Reactivo de molibdato de amonio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 12054-85-2]: disolver 20 g de molibdato de amonio en 500 mL de agua 8.1. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.
- 8.8. Solución de ácido ascórbico 0,1 M: Disolver 1,76 g de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ Nro. CAS 50-81-7) en 100 mL de agua desionizada. La solución es estable por una semana a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$).
- 8.9. Solución estándar stock de fosfato, 50 mg P/L: usar estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado). Alternativamente disolver en agua 8.1 219,5 mg de KH_2PO_4 (Nro. CAS 7778-77-0) anhidro previamente secado a 105°C y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses. En forma alternativa, emplear material de referencia certificado.
- 8.10. Solución de trabajo, 1 mg P/L. Diluir la solución stock 50 veces: 10,00 mL en 500 mL, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso con resolución de 0,01 g. Esta solución es estable por 1 mes. Si se utiliza un estándar comercial como solución stock, debe realizarse en la dilución que corresponda de acuerdo a la concentración.
- 8.11. Solución control de fosfato, 50 mg P/L. La misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINAMA. Alternativamente se puede utilizar un estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado) y realizar las diluciones correspondientes.
- 8.12. Solución de tartrato de antimonio y potasio: disolver 1,3715 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ (Nro. CAS 12054-85-2) (o 1,4706 de trihidratado) en 400 mL de agua 8.1 en un matraz de 500 mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.
- 8.13. Reactivo combinado: preparar inmediatamente antes del desarrollo de color 100 mL de reactivo combinado,



mezclando en el orden dado los siguientes reactivos:

- 50 mL de H₂SO₄ 5 N
- 5 mL de tartrato de antimonio y potasio
- 15 mL de molibdato de amonio
- 30 mL de ácido ascórbico.

Se emplea 3,2 mL de esta solución por cada tubo para el desarrollo de color. Tener en cuenta esto al calcular la cantidad de solución necesaria para toda la corrida.

8.14. HCl 1+1: se prepara diluyendo HCl comercial, al medio con agua 8.1.

Importante: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente previo al mezclado.

Mezclar después de la adición de cada reactivo. Si la solución presenta turbidez agitar y dejar descansar por unos minutos hasta que la turbidez desaparezca. En caso de que la turbidez no desaparezca debe reiterarse la preparación de éste reactivo. Este reactivo es estable por 4 horas.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material para el análisis, utilizado debe ser de vidrio.
- 9.2. Todo el material debe tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 y finalmente tres enjuagues con agua desionizada.
- 9.3. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.
- 9.4. Se recomienda realizar la digestión de la muestra antes de las 48 horas. La muestra digerida puede conservarse a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante siete días.
- 9.5. Tener en cuenta no ajustar demasiado los tapones de los frascos previo a la digestión, debido a que luego será muy difícil su apertura.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Digestión y Neutralización

10.1.1. Registrar la masa de los frascos de digestión totalmente secos, y luego hacer tomas por pesada con resolución de 0,01 g de la solución de trabajo, según el siguiente esquema. Completar a 80 mL con agua desionizada.

Realizar las tomas de la solución de trabajo de 1 mg P/L como se indica a continuación, completando a 80 mL con agua desionizada como volumen final.

| Toma de solución trabajo en peso (gr) | Volumen Final previo a la digestión | Concentración final aprox. En 100 mL (microg P/L) |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 0,00 | 80 | 0 |
| 1,00 | 80 | 10 |
| 3,00 | 80 | 30 |
| 10,00 | 80 | 100 |
| 20,00 | 80 | 200 |
| 50,00 | 80 | 500 |
| 80,00 | 80 | 800 |

Nota 4: se asume una densidad de 1 g/mL

10.1.2. Adicionar 1 gota de indicador de fenoltaleína. Si se desarrolla un color rojizo, adicionar H₂SO₄ hasta que el color desaparezca. Luego adicionar 1 mL de solución de H₂SO₄.

- 10.1.3. A cada frasco agregar 0,4 g de reactivo de persulfato de amonio o 0,5 g de persulfato de potasio y 1 mL de ácido sulfúrico al 30 %.
- 10.1.4. Digerir la muestra en autoclave durante 30 minutos a una presión entre 98 y 137 kPa.
- 10.1.5. Dejar alcanzar la temperatura ambiente.
- 10.1.6. El desarrollo de color se puede realizar a continuación o pueden guardarse los frascos conteniendo el material digerido en heladera $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 7 días. Esa es la fecha de vencimiento para realizar el desarrollo de color.
- 10.1.7. Previo al desarrollo de color: Agregar una gota de reactivo acuoso de fenoftaleína a cada frasco de digestión. Neutralizar con la solución NaOH 1 N hasta viraje a color levemente rosado.

Nota 5: la neutralización insume aproximadamente 12 mL.

- 10.1.8. Luego de la neutralización, llevar con agua desionizada hasta 100 mL registrar el peso final.

10.2. Desarrollo de Color

- 10.2.1. Realizar tomas en peso de cada frasco de digestión, de 20 mL con resolución de 0,01 g en los tubos o celdas de lectura.
- 10.2.2. Realizar el ajuste de cero del instrumento con un tubo o celda de lectura con agua desionizada.
- 10.2.3. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado a esta medida se le llamará Abs_{Blanco} .
- 10.2.4. Agregar agitando vigorosamente a cada tubo 3.2 mL del reactivo combinado.
- 10.2.5. Medir la absorbancia de las soluciones a 880 nm de longitud de onda, entre 10 y 30 minutos luego de agregado el reactivo combinado.
- 10.2.6. Realizar la gráfica de $(Abs_{\text{estándar}} - Abs_{\text{Blanco}})$ en función de concentración del estándar en $\mu\text{g P/L}$.

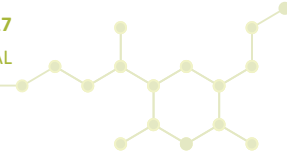
11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Nota 6: el análisis de la muestra se procesa simultáneamente con los estándares para calibración del método.

- 11.1. Registrar el peso del frasco de digestión de muestra totalmente seco. Tomar por pesada 80 mL de muestra o la dilución que corresponda, con resolución 0,01 g.
- 11.2. Adicionar 1 gota de indicador de fenoltaleína. Si se desarrolla un color rojizo, adicionar H_2SO_4 hasta que el color desaparezca. Luego adicionar 1 mL de solución de H_2SO_4 .
- 11.3. Agregar 0,4 g de reactivo de persulfato de amonio o 0,5 g de persulfato de potasio y 1 mL de ácido sulfúrico al 30 %.

Nota 7: emplear el mismo reactivo para la curva de calibración así como para las muestras.

- 11.4. Realizar la digestión en autoclave durante 30 minutos luego de alcanzada la presión de trabajo.
- 11.5. Dejar enfriar a temperatura ambiente. El desarrollo de color se puede realizar a continuación o pueden guardarse los frascos conteniendo el material digerido en heladera a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 7 días. Esa es la fecha de vencimiento para realizar el desarrollo de color. Tomar el mismo criterio para la curva de calibración, el control y las muestras.
- 11.6. Agregar una gota de reactivo acuoso de fenoftaleína. Neutralizar con la solución NaOH 1 N hasta viraje a color levemente rosado.
- 11.7. Luego de la neutralización llevar a 100 mL con agua desionizada y registrar el peso final.
- 11.8. De cada frasco de digestión tomar en peso 20 mL con resolución de 0,01g en los tubos o celdas de lectura. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado a esta medida se le llamará Abs Cero.
- 11.9. Agregar agitando vigorosamente 3,2 mL del reactivo combinado. Medir la absorbancia de las soluciones a 880 nm de longitud de onda, entre 10 y 30 minutos luego de agregado del reactivo combinado, a esta medida se le llamará Abs_{Muestra} .



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La concentración de fósforo de los estándares de la curva de calibración se calcula según:

$$\mu\text{g P/L} = Pt / (Pf - PF) \times d$$

donde:

$\mu\text{g P/L}$: corresponde a la concentración de fósforo en el estándar

Pt: corresponde a la toma en peso de la solución de trabajo (g)

Pf: corresponde al peso final (Frasco + Toma + Reactivos + Agua luego de la neutralización).

PF: corresponde al peso del frasco de digestión (g)

d: corresponde a densidad del agua a temperatura ambiente (considerar 1 g/mL).

La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs}_{\text{estándar}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) = a \times (\mu\text{g P/L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la recta respectivamente

La concentración de fosfato en la muestra se calcula según:

$$\text{Fósforo Total, } \mu\text{g P/L} = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{cero}} - b) \times \text{FD}_1 \times \text{FD}_2}{a}$$

donde:

FD_1 : (factor de dilución de la muestra) = volumen final en frasco / toma de la muestra

FD_2 : Volumen final en la celda de lectura/ toma de la muestra a partir del digesto

Abs_{cero} : corresponde a la absorbancia de la muestra previo al agregado del reactivo combinado, si no se lee la Abs_{cero} sustituir esta por la $\text{Abs}_{\text{blanco}}$.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** Tomar una cantidad determinada de la solución de "Control de Fósforo" (elaborada por el Responsable de Calidad) de manera que se encuentre ubicada su concentración en el centro de la curva de calibración, para digerir simultáneamente con las muestras, su puede utilizar de forma alternativa un estándar comercial (con valor certificado). Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición del análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Control de la precisión:** realizar la digestión por duplicado de una cada tres de las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos correspondientes. La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición del análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.3. **Porcentaje de recuperación:** realizar el análisis de porcentaje de recuperación en todas las muestras para la matriz aguas residuales (efluentes) y en 1 de cada 5, para aguas naturales. Llevar a cabo los gráficos de control correspondientes según Manual de Control de Calidad Analítico. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición del análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd Edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-P B Sample preparation y 4500-P E Ascorbic acid method pp. 4-151 a 4-152 y pp. 4-155 a pp-156.



4014UY

Determinación de fósforo total en aguas y efluentes



Flow Injection Analysis (FIA)

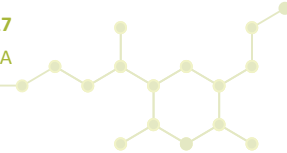
Elaborado - E. Broggi

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Se denomina fósforo total a todo el fósforo presente en una muestra, que corresponde a ortofosfato, fosfatos condensados y fosfatos unidos a materia orgánica.

Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo total en aguas naturales, salobres o salinas, y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de (0,050 – 50) mg P/L y el rango lineal (0,050 – 10) mg P/L. El límite de detección es de 15 µg P/L

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 78)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B, INE 06)
- 2.7. Ruta de análisis (RFQ 27)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método se basa en la digestión de varias formas de fósforo a ortofosfato mediante peroxodisulfato con digestión UV en línea. El fósforo orgánico es transformado a ortofosfato por la digestión con persulfato catalizada mediante luz UV. Los polifosfatos son transformados a ortofosfato por digestión con ácido sulfúrico también en línea. El proceso de digestión se lleva a cabo previo a la válvula de muestra del equipo. Una porción de la muestra digerida es luego inyectada y los fosfatos determinados mediante FIA.

El ión ortofosfato (PO_4^{3-}) reacciona con molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio en medio ácido para formar un complejo. Este complejo es reducido con ácido ascórbico para formar un complejo de color azul que absorbe a 880 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de ortofosfato en la muestra en el rango de (0,050 – 10) mg P/L.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. En particular el persulfato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio son tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.
- 4.4. El ácido sulfúrico es corrosivo y debe tratarse con las precauciones del caso.

Nota 1: Al preparar el ácido sulfúrico diluido, verter el mismo sobre el agua destilada y no al contrario debido a que produce una reacción exotérmica.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso, en concentraciones por encima de 0,1 mg As/L.
- 5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 mg/L y entre 10 % y 15 % más bajo a concentraciones de 10 mg/L.
- 5.3. Na_2S no interfiere con la determinación si se encuentra en concentraciones menores que 1,0 mg/L
- 5.4. El ión silicato interfiere si está presente en concentraciones mayores que 10 mg/L. En general la interferencia es insignificante ya que se requeriría una concentración de aprox. 30 mg/L para producir una interferencia positiva de 0,005 mg P/L.
- 5.5. Concentraciones de hierro mayores a 50 mg/L producen un error negativo por competencia con el complejo por el agente de reducción de ácido ascórbico.

- 5.6. La contaminación del material de vidrio es un problema en las determinaciones de bajos niveles de fósforo. El material debe lavarse idealmente con HCl diluido caliente y luego con agua desionizada.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar aproximadamente 100 mL muestra en frasco de vidrio, o plástico lavado sin detergente y enjuagado con HCl 1+1 y posteriormente con agua desionizada.
- 6.2. Mantener la muestra refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C).
- 6.3. Filtrar la muestra (si se desea analizar el contenido soluble). Realizar la determinación dentro de las 48 h luego del muestreo.
- 6.4. En caso de no poder determinarse en los tiempos mencionados, la muestra puede ser preservada congelada, a temperatura ≤ -10 °C, durante un máximo de 28 días. Las muestras con bajo contenido de fósforo no deben ser almacenadas en plástico por períodos largos de tiempo a menos que se preserven congeladas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

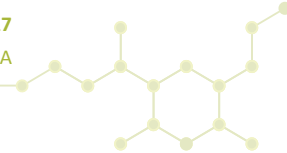
- 7.1. Balanza de resolución 0,001 g (Uso: preparación de curva de calibración y diluciones de soluciones control)
- 7.2. Balanza de resolución 0,0001 g (Uso: preparación de solución estándar stock y soluciones control)
- 7.3. Balanza de resolución de 0,01 g (Uso: dilución de muestras)
- 7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 – 10,00) mL y (100 – 1000) μ L.
- 7.5. Matraces aforados de 1000 mL y 100 mL.
- 7.6. Frascos o matraces Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL
- 7.7. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold y digestor para la determinación de fósforo total (LACHAT QuickChem 8500 o similar)

Nota 2: todo el material que se utilice debe lavarse sin detergente, enjuagarse con HCl 1+1 y posteriormente con agua desionizada.

8. REACTIVOS

Nota 3: Es recomendable desgasear los reactivos que se utilizan en el sistema de inyección en flujo (excepto los estándares y controles) para prevenir formación de burbujas en el sistema.

- 8.1. **Solución de molibdato de amonio:** pesar 20,0 g de molibdato de amonio tetrahidratado $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ Nro. CAS 12054-85-2) y verter en un matraz aforado de 500 mL pesar. Agregar agua desionizada y disolver con agitador magnético durante al menos 4 horas. Llevar hasta aforo con agua desionizada. Almacenar en plástico y refrigerar. La solución es estable por 4 meses.
- 8.2. **Solución de tartrato de antimonio y potasio:** pesar 1,61 g de tartrato de antimonio y potasio trihidratado ó 1,50 g del reactivo hemihidratado $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$ Nro. CAS 28300-74-5) y verter en un matraz aforado de 500 mL. Agregar agua desionizada y disolver con agitador magnético. Llevar hasta aforo con agua desionizada. Almacenar en plástico oscuro y refrigerar. La solución es estable por 4 meses.
- 8.3. **Reactivo combinado de color:** pesar en un recipiente adecuado 178,75 g de agua desionizada, agregar 53,25 g de la solución de molibdato de amonio y 18 g de la solución de tartrato de antimonio y potasio. Luego añadir 5,7 g de hidróxido de sodio ($\text{NaOH}_{(s)}$ Nro. CAS 1310-73-2). Agitar y disolver (desgasear en caso de ser necesario). Preparar semanalmente.
- 8.4. Solución de reducción de ácido ascórbico: pesar en un recipiente adecuado 14 g de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ Nro. CAS 50-81-7) y agregar 195 g de agua desionizada. Mezclar con agitador magnético hasta disolver (desgasear si es necesario). Añadir 0,2 g de dodecil sulfato de sodio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ Nro. CAS 151-21-3). Mezclar con agitador magnético. La solución es estable durante 2 días.
- 8.5. Solución carrier de ácido sulfúrico: en un recipiente adecuado pesar 240,5 g de agua desionizada, agregar lentamente 17,5 g de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9). Enfriar la solución (desgasear si es necesario) y agregar 1,25 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5). Luego añadir 0,20 g de dodecil sulfato de sodio. Invertir para mezclar.
- 8.6. **Reactivo de digestión 1:** en un recipiente adecuado agregar 223,4 g de agua desionizada y luego, lentamente,



49,0 g de ácido sulfúrico concentrado. (CUIDADO: esta solución se torna muy caliente). Desgasear si es necesario antes de utilizar. Preparar semanalmente.

- 8.7. **Reactivo de digestión 2:** en un recipiente adecuado agregar 250 g de agua desionizada y luego 6,5 g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$ Nro. CAS 7727-21-1). Mezclar con agitador magnético hasta disolver. Preparar semanalmente y desgasear si es necesario antes de utilizar.
- 8.8. **Solución estándar stock de fosfato, 50 mg P/L:** usar estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado). Alternativamente disolver en agua destilada 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro previamente secado a 105 °C (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses. Otra opción es utilizar estándar comercial, de alrededor de 1000 mg P/L de concentración (con valor certificado).
- 8.9. **Solución control de fosfato, 50 mg P/L.** La misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINAMA.
- 8.10. **Soluciones control de digestión, 1000 mg P/L.** (Fenil fosfato $C_6H_5Na_2O_4P \cdot 2H_2O$ Nro. CAS 66778-08-3, Trimetil fosfato $C_3H_9O_4P$ Nro. CAS 512-56-1, Pirofosfato de sodio $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ Nro. CAS 13472-36-1, Tripolifosfato de sodio $Na_5P_3O_{10}$ Nro. CAS 7758-29-4). Las mismas se preparan de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINAMA.
- 8.11. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

Nota 4: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Todo el material utilizado debe tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 y finalmente tres enjuagues con agua destilada.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar una serie de estándares a partir de la solución 8.8, de acuerdo al siguiente cuadro:

| Conc. Std. (mg PO_4 - P/L) | masa sol. estándar (g) | masa fin (g) | Conc. aprox. fin (mg PO_4 - P/L) |
|---------------------------------|------------------------|--------------|---------------------------------------|
| 50 | 10 | 50 | 10 |
| 10 | 5 | 50 | 1 |
| 10 | 2,5 | 50 | 0,5 |
| 10 | 1,25 | 50 | 0,25 |
| 10 | 0,5 | 50 | 0,10 |
| 10 | 0,25 | 50 | 0,050 |

- 10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de la solución 8.9, de acuerdo a la siguiente dilución:

| Conc. Std. (mg PO_4 - P/L) | masa sol. estándar (g) | masa fin (g) | Conc. aprox. fin (mg PO_4 - P/L) |
|---------------------------------|------------------------|--------------|---------------------------------------|
| 50 | 0,50 | 50 | 0,50 |

Nota 5: se asume una densidad de 1 g/mL para todas las diluciones

- 10.3. En caso de analizar únicamente aguas naturales, puede utilizarse el rango de (0,050 – 1) mg PO_4 -P/L. Para efluentes es recomendable trabajar en el rango de (0,050 – 10) mg PO_4 -P/L. En cualquiera de los dos rangos es suficiente con trabajar con 5 estándares para la construcción de la curva de calibración. Asimismo, es posible analizar tanto aguas y efluentes trabajando en un único rango entre (0,050 – 10) mg PO_4 -P/L.

- 10.4. Encender el equipo de inyección en flujo y el digestor.
- 10.5. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.
- 10.6. Colocar cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar a la temperatura de trabajo (125 °C) por unos 15 minutos. **Nunca trabajar con el digestor por encima de 70 °C sin hacer pasar líquido a través del mismo.**
- 10.7. Colocar los estándares de la curva de calibración y el control en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua desionizada y luego del estándar de menor a mayor concentración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

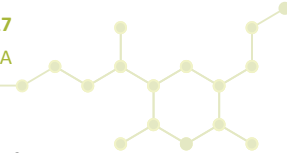
- 11.1. Colocar una porción de cada muestra a analizar en los tubos del rack del autosampler (enjuagar previamente cada tubo con la muestra a ser contenida en el mismo)
- 11.2. Las muestras de aguas naturales se analizan en forma directa (sin dilución).
- 11.3. Para efluentes cargados se aconseja realizar una dilución entre 10 y 20 veces. Realizar y registrar la masa de la muestra y la masa final de la dilución.
- 11.4. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, controles y muestras.
- 11.5. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.
- 11.6. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración Área en función de la Concentración y calcula la concentración de los controles y las muestras.
- 12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.
- 12.3. Eventualmente se pueden seleccionar los estándares que efectivamente se desea que conformen curva de calibración y recalcular las concentraciones (esto es efectuado automáticamente por el programa)
- 12.4. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.
- 12.5. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.
- 12.6. Se toma el mismo criterio de aceptación de la curva patrón que el utilizado en la validación del método.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo al punto 10.2. Analizar el control de exactitud luego de la curva de calibración. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes. Si el resultado del control de la curva está fuera de control revisar el procedimiento y si corresponde repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.
- 13.2. **Control de la exactitud continuo:** Analizar el control de exactitud (según punto 10.2) en la secuencia luego de la curva de calibración y cada 5 muestras de efluentes ó 10 muestras de aguas, y al final de toda la secuencia. Se aceptara una desviación de $\pm 10\%$ del valor real de concentración del estándar.
- 13.3. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada cinco muestras de aguas y uno cada tres muestras de efluentes, o al menos uno por serie de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un 10 % para matrices líquidas. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.4. **Porcentaje de recuperación:** En un recipiente adecuado pesar 50 g de la muestra a ser analizada y fortificar con 250 μL , tomados con pipeta de (100 – 1000 μL) calibrada, de la solución control de 50 mg PO_4/L . Si los



efluentes fueron diluidos se debe fortificar la dilución y no la muestra original. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentren bajo control estadístico en el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, revisar el procedimiento y si corresponde repetir el análisis.

- 13.5. **Control de digestión:** Preparar rutinariamente soluciones de digestión de 1 mg P/L, mediante dilución de los controles de digestión preparados de acuerdo al Manual de Control de Calidad. Para dichos controles se aceptaran recuperaciones superiores al 90 %. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite establecido, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.
- 13.6. **Control de blancos:** Realizar una inyección de un blanco de agua desionizada después de la curva de calibración y cada cinco muestras de efluentes y/o aguas. La concentración de esta muestra blanco debe ser menor al límite de cuantificación, de forma de verificar que el equipo no arrastra contaminación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite establecido, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. LCHAT METHOD MANUAL, QuikChem® Method 10-115-01-3-A, Determination of total phosphorus by FIA colorimetry with on-line digestion. (basado en EPA-600/R-93-100, Revised March 1993, Method 365.1).
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. MPHA, 4500-P E Ascorbic Acid Method y 4500-P I In line UV/persulfate digestion and flow injection analysis for total phosphorus pp. 4-155 a 4-157 y 4-160 a 4-162.



4015UY

Determinación de fósforo disponible en suelos



Método espectrofotométrico

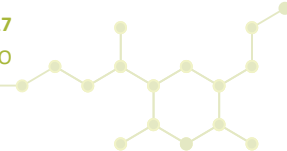
Elaborado - A. Bazzano

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. El fósforo disponible en el suelo corresponde a una pequeña fracción del fósforo total contenido en el suelo, reflejando el fósforo en solución y aquella fracción que se encuentra en la fase sólida, susceptibles a ser asimiladas por las plantas.
- 1.2. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo disponible en suelos con un pH neutro o ácido.
- 1.3. El fósforo disponible en suelo se extrae con una solución de ácido clorhídrico (HCl) y fluoruro de amonio (NH_4F), que luego de centrifugarlo y filtrarlo se determina por una técnica colorimétrica.
- 1.4. Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo disponible en un rango de 1,6 mg P/kg (límite de cuantificación) a 50 mg P/kg.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de Mantenimiento y Control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Determinación de pH en suelo y residuos.” (1016 UY)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza analítica con resolución 0,1 mg (INE 94)
- 2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto con resolución 0,01 g (INE 16A)
- 2.8. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 38)
- 2.9. Instructivo de uso de agitador orbital (INE 102)
- 2.10. Instructivo de uso de centrifuga (INE 49)
- 2.11. Instructivo de uso de peachímetro (INE 98)
- 2.12. Ruta de análisis (RFQ 33)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

La técnica consta de dos etapas:

3.1. Extracción

El HCl disuelve principalmente los fosfatos de calcio y algunos de hierro y aluminio, mientras que los fluoruros promueven la desorción de los fosfatos ligados al hierro y al aluminio. El ion fluoruro al disminuir la actividad del Al^{3+} , Ca^{2+} y Fe^{3+} por la formación de complejos, evita la adsorción de los fosfatos solubilizados.

3.2. Determinación espectrofotométrica

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo reactivo, que se mide en un espectrofotómetro a 882 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

3.3. El resultado se expresa en base seca, secado en estufa a $110\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El tartrato de antimonio y potasio, y el fluoruro de amonio son sumamente tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El procedimiento es muy sensible a la proporción suelo-solución extractora, la agitación y el tiempo de agitación.

5.2. El pH del suelo también es un factor a tener en cuenta, ya que este método sólo se puede utilizar para suelos neutros-ácidos; los suelos básicos neutralizan la solución extractora, perdiendo así la capacidad de extraer. Los suelos deben tener un pH < 7,5.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en una bolsa de polietileno con cierre hermético e impermeable. Muestra mínima 500 g; preservar refrigerada a ≤ 6 °C (> 0°C).

6.2. La determinación de pH del suelo y el secado del mismo deben ser realizadas lo antes posible.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro, longitud de onda 882 nm, con camino óptico de 2,5 cm o mayor

7.2. Celda: tubos de 25 ó 50 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro

7.3. Balanza de resolución de 0,01 g

7.4. Balanza de resolución de 0,001 g

7.5. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 100 a 1000 μ L

7.7. Matraz aforado de 1000 mL

7.8. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 1000 mL

7.9. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL

7.10. Bomba de vacío

7.11. Filtros de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de diámetro de poro

7.12. Tubos tipo Falcon de 50 mL

7.13. Agitador orbital

7.14. Centrífuga

7.15. Mortero de porcelana

7.16. Estufa de secado 30 °C \pm 5 °C y 110 °C \pm 5 °C

7.17. Placas de Petri

7.18. Tamiz de 2 mm

7.19. Plancha calefactora

7.20. Peachímetro

8. REACTIVOS

8.1. Solución sulfúrico-tartrato-molibdato:

- Calentar a ebullición 200 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer de 1 L y agregar 60 g de molibdato de amonio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O Nro. CAS 12054-85-2] disolver y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Disolver aproximadamente 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio [K(SbO)C₄H₄O₆·½H₂O] Nro. CAS 28300-74-5] en la solución de molibdato.

- Agregar lenta y cuidadosamente con una probeta 700 mL de ácido sulfúrico conc. (H₂SO₄ Nro. CAS 7664-93-9), enfriar y llevar a 1 L con agua desionizada, mantener en la oscuridad y a temperatura de heladera. Solución estable por 6 meses.

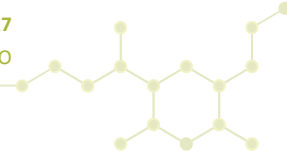
8.2. Solución de ácido ascórbico: disolver 6,6 g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆ Nro. CAS 50-81-7) en 50 mL de agua desionizada. Preparar la solución al momento de utilizarla.

8.3. Ácido clorhídrico 1 N: colocar 500 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer de 1 L, agregar aprox. 83 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl conc. Nro. CAS7647-01-1). Llevar a 1 L. Solución estable por 6 meses.

8.4. Solución extractora Bray No. 1 (0,025 N HCl y 0,03 N NH₄F):

- Pesar aprox. 2,22g de fluoruro de amonio (NH₄F Nro. CAS 12125-01-8) y disolverlos en 1 L de agua desionizada.

- Agregar con una probeta 50 mL de HCl 1N y llevar a 2 L en el recipiente de 2 L de polietileno.



- Trasvasar una alícuota a un vaso de Bohemia y medir el pH.
 - Ajustar el pH de la solución agregando gotas de NH_4OH (hidróxido de amonio Nro. CAS 1336-21-6) y HCl hasta un pH de $2,6 \pm 0,5$. Solución estable por 6 meses.
- 8.5. Solución para desarrollo de color:
- En un matraz de 1 L mezclar 25 mL de solución sulfúrico-tartrato-molibdato con 800 mL de agua desionizada.
 - Agregar 10 mL de solución de ácido ascórbico y llevar a 1 L
 - Esperar 1 hora antes de usar, preparar diariamente.
- 8.6. Solución patrón 100 mg P/L:
- Disolver 0,4394 g de fosfato monobásico de potasio patrón primario anhidro (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) secado en estufa 2 horas a 110°C en un matraz aforado de 1000 mL, con 800 mL de solución extractora. Disolver y llevar a volumen con solución extractora.
 - Trasvasar a una botella de plástico de 1 L. Guardar a temperatura de heladera. La solución es estable por 1 semana.
- 8.7. Soluciones de trabajo 10 mg P/L: Pesar 10 g de solución patrón 100 mg P/L en matraz Erlenmeyer y llevarlo a 100 g con solución extractora, preparar al momento de utilizarla.
- 8.8. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No utilizar material de vidrio para almacenar cualquier solución que contenga solución extractora ya que los iones fluoruro en medio ácido reaccionan con el vidrio.
- 9.2. Todo el material debe tener un tratamiento de lavado sin detergente.
- 9.3. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. A partir de la solución de trabajo de 10 mg P/L, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados deben ser tomados con pipeta automática de volumen variable 1-10 mL, material aforado o por pesada con precisión 0,01 g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL. Se lleva a volumen final con solución extractora.

| Volumen de Solución Trabajo | Volumen final | Concentración en mg P/L |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|
| 0 | 25 | 0 |
| 0,50 | 25 | 0,2 |
| 1 | 25 | 0,4 |
| 2 | 25 | 0,8 |
| 5 | 25 | 2 |
| 10 | 25 | 4 |
| 12,5 | 25 | 5 |

- 10.2. Medir un punto de solución control junto con la curva de calibración.
- 10.3. Realizar el ajuste de cero del instrumento con una celda de lectura conteniendo agua destilada.
- 10.4. Colocar 2 mL de cada dilución en tubos o celda de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm camino óptico, y agregar 8 mL de agua desionizada.
- 10.5. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado. Esta medida es considerada, Abs inicial.
- 10.6. Agregar 8 mL de solución para desarrollo de color y esperar 20 minutos.
- 10.7. Medir la absorbancia de las soluciones a 882 nm de longitud de onda. Esta medida es considerada Abs final.
- 10.8. Realizar la gráfica de (Abs final – Abs inicial) en función de concentración del estándar en mg P/L.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Medir el pH de la muestra al momento de llegar al laboratorio como indica el procedimiento 1016UY "Determinación de pH en suelo y residuos".

11.2. Secado de la muestra:

- Talar una placa de Petri de unos 15 cm de diámetro y colocar entre 100 y 200 g de la muestra y registrar la masa al gramo, colocar la muestra de modo que tenga la mayor superficie de exposición.
- Colocar la placa en una estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre 3 y 7 días hasta masa constante, con concordancia al gramo.
- Alternativamente se puede secar a temperatura ambiente a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, el proceso de secado debe ser lo más rápido posible para minimizar la posible actividad microbiana.
- En ninguno de los dos casos sobrepasar los $38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11.3. Relación secado $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ - secado $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Talar una placa de Petri de unos 15 cm de diámetro y colocar entre 10 y 20 g de suelo ya seco a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Registrar esa masa.
- Luego pesar la placa de Petri más la muestra y registrar la masa.
- Secar la muestra en una estufa a $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 12 a 16 horas.
- Dejar enfriar la placa de Petri en un desecador media hora.
- Repetir el procedimiento hasta peso constante. Registrar la masa final.
- Utilizar la relación entre ambas masas para corregir los datos obtenidos.

11.4. Partículas menores a 2 mm:

- Morterear para aplastar los terrones de modo que puedan pasar un tamiz de 2 mm.
- Colocar un papel sobre la mesada y sobre ese papel colocar un tamiz de malla de 2 mm.
- Pasar la muestra seca y mortereada por el tamiz y quedarse con la fracción recibida en el papel.
- Mover el suelo tamizado en el papel de las esquinas hacia el centro para mezclarlo, repetir el proceso de mezclado 4 veces.

11.5. Preparación de los filtros:

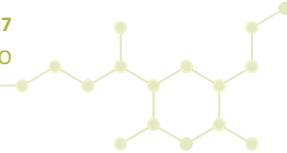
- Utilizar filtros de membrana comerciales preparados, en caso contrario, deben ser lavados antes de ser usados, ya que podrían contribuir con cantidades significativas de fósforo a muestras de bajas concentraciones.

Existen dos formas de preparación de filtros:

- Empapar 50 filtros en 2 L de agua destilada durante 1 hora, luego cambiar el agua y dejarlos por tres horas más.
- Empapar 50 filtros en 2 L de agua destilada durante 24 horas.

11.6. Análisis de la muestra:

- Colocar 2,5 g de muestra de suelo previamente molida y seca hasta masa constante en una estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un diámetro de partícula menor a 2 mm en un tubo Falcon de 50 mL.
- Agregar al tubo 25 g de solución extractora.
- Colocar los tubos en el agitador orbital 15 minutos a 200 oscilaciones por minuto.
- Retirar los tubos del agitador y colocarlos en la centrifuga 10 minutos a 2000 r/min.
- Filtrar al vacío una pequeña alícuota del sobrenadante y enjuagar el recipiente donde se recibe el filtrado, descartar la alícuota, y proceder a filtrar el resto del sobrenadante.
- El desarrollo de color se puede realizar a continuación o pueden guardarse los extractos en heladera a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y realizar el análisis dentro de las 72 horas.
- Transferir 2 mL del sobrenadante filtrado en un tubo o celda de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm camino óptico.
- Agregar 8 mL de agua desionizada y medir la absorbancia a 882 nm en el espectrofotómetro, registrar esa absorbancia como Abs inicial.
- En el mismo tubo o celda de lectura agregar 8 mL de la solución para desarrollo de color y esperar 20 min.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro y registrarla como Abs final.



12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs final} - \text{Abs inicial}) = a \times (\text{mg P/L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la recta respectivamente

Rechazar la curva si el coeficiente de regresión (r^2) es menor a 0,99, repetir el procedimiento de preparación de las soluciones de calibración.

12.2. La concentración de fósforo en la muestra se calcula según:

$$[\text{Psuelo}] \text{ mg P/kg} = \frac{(A - B) \times D}{C \times E}$$

donde:

A: corresponde Abs final – Abs inicial.

B: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración.

C: corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

D: corresponde a la masa de solución extractora.

E: corresponde a la masa de suelo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Tomar la cantidad necesaria de la solución de “Control de Fósforo” (elaborada por el Responsable de Calidad) en un tubo o celda de lectura; realizar la toma de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con la curva de calibración. Comparar el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico). La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos. Se aceptan rangos normalizados menores a 20 %, hasta que se cuente con los suficientes datos para generar un gráfico de control según PGC 05.

13.3. **Control de efecto matriz:** realizar el fortificado de todas las muestras con una solución de concentración conocida. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Se aceptan % de recuperación entre 75 – 125 %, hasta que se cuente con los suficientes datos para generar un gráfico de control según PGC 13. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

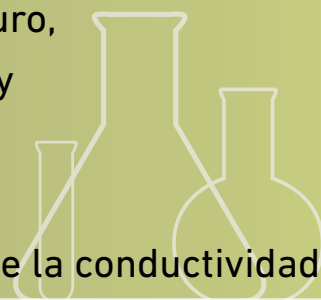
14.1. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service Soil Survey Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 51 Version 1.0, pág. 1.022-23 85-88

14.2. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service Soil Survey Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 42 Version 4.0, pág. 231-234



4029UY

Determinación de Aniones Inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales líquidos



Método Cromatografía Iónica con supresión de la conductividad

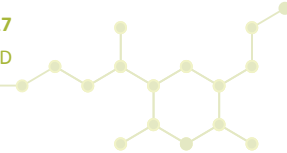
Elaborado - V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.
- 1.2. Los límites de cuantificación son los siguientes: fluoruro 0,1 mg/L, cloruro 0,1 mg/L, nitrato 0,1 mg/L y sulfato 0,2 mg/L. Los límites de detección son: cloruro 0,01 mg/L, nitrato 0,01 mg/L y sulfato 0,05 mg/L. Para el caso de efluentes industriales, los límites estarán determinados según la matriz.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del Shimadzu HIC-20A super (INE 104).
- 2.6. Instructivos de uso de balanzas (INE 07, INE 93, INE 06, INE 94).
- 2.7. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 36).
- 2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28).
- 2.9. Instructivo de baño con ultrasonido (INE 69).
- 2.10. Rutas de análisis (RIN 41 y RIN 13).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los aniones de interés son separados según su afinidad relativa en una columna de intercambio aniónico. Luego, los aniones separados son introducidos en dispositivo que suprime de la conductividad de la fase móvil y convierte los aniones en sus formas ácidas altamente conductoras aumentando la respuesta al analito. La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los aniones de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requiere túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector, será una interferencia. Por ejemplo, altas concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación de fluoruro y cloruro.
- 5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano, la dilución de la muestra puede superar la interferencia.
- 5.3. La elución del fluoruro puede darse cerca de la depresión de la línea de base causada por la elución del agua (water dip), puede causar dificultades en la cuantificación de muestras con baja concentración de este anión. La dilución de la muestra con fase móvil concentrada puede resolver esta interferencia, en este caso los estándares deberán ser tratados de igual manera.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de 0,5 L de capacidad, con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Si se va a determinar nitrato, realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Para la determinación de sulfato, fluoruro y cloruro, el tiempo de análisis es de hasta 28 días manteniendo la muestra a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper compuesto por:
- Bandeja para los reservorios de fase móvil
 - Desgasificador de fase móvil en línea (DGU-20 A3R)
 - Bomba para la fase móvil (LC-20ADsp)
 - Inyector automático SIL-10 Ai con loop de 50 µL.
 - Horno para Columna (CTO-20ACsp)
 - Detector de conductividad (CDD-10Asp)
 - Dispositivo de comunicación (CBM-20 A)
 - Precolumna Shim-pack IC-SA2G ó similar (opcional)
 - Columna aniónica Shim-pack IC-SA2, diámetro interno 4,0 mm; largo 25 cm ó equivalente.
 - Cartuchos Supresores de la conductividad (P/N228-40612-91)
- 7.2. Equipo de ultrasonido.
- 7.3. Balanza de resolución 0,00001 g.
- 7.4. Balanza de resolución 0,001 g.
- 7.5. Balanza de resolución 0,0001 g.
- 7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.
- 7.7. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.
- 7.8. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.
- 7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.
- 7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.
- 7.11. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

8. REACTIVOS

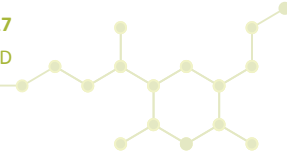
- 8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución de elución concentrada NaHCO₃ 120 mM /NaCO₃ 6 mM: disolver 5,040 g de NaHCO₃ y 0,318 g de NaCO₃ llevar a 500 mL con agua 8.1.
- 8.3. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta. Pesar con resolución de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua 8.1 a 50 mL en tubo de plástico de 50 mL. Preservar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 "Planilla de Datos de Preparación de estándares". Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales de trazabilidad adecuada.

| Anión | Sal | Peso (g) |
|----------|---|----------|
| Fluoruro | NaF Nro. CAS 7681-49-4 | 0,1105 |
| Cloruro | NaCl Nro. CAS 7647-14-5 | 0,0824 |
| Nitrato | NaNO ₃ Nro. CAS 7631-99-4 | 0,0685 |
| Sulfato | K ₂ SO ₄ Nro. CAS 7778-80-5 | 0,0910 |

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Las determinaciones en aguas de lluvia son a niveles de trazas, por lo que hay que extremar cuidados para evitar la contaminación.
- 9.2. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.



- 9.3. El resto del material debe ser lavado por enjuague con agua 8.1 sin utilizar ácidos ni detergentes. En caso de contener material sólido adherido usar solventes orgánicos para removerlos y luego enjuagar tres veces con agua 8.1.
- 9.4. Las muestras deben filtrarse en el sector destinado para aniones.
- 9.5. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.
- 9.6. El recipiente para la fase móvil debe ser sonicado con agua 8.1 durante 10 min, previo a su llenado con la fase móvil.
- 9.7. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, previo a su introducción en el IC.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar por lo menos 5 soluciones estándares conteniendo mezcla de los aniones que se quieren determinar y un blanco, por dilución de la solución stock de estándares con agua 8.1. Utilizar estándares de manera de abarcar las concentraciones de aniones esperadas para las muestras analizadas. Preparar estas soluciones mensualmente (registrar en la Ruta de Análisis 41).
- 10.2. Identificar en el cromatograma de cada estándar el pico correspondiente a cada anión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada anión.
- 10.3. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras y al final de la corrida inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de resolución 0,01 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

Nota 3: En caso de que la concentración esperada de los aniones, se encuentren cercanos a los límites de detección/cuantificación, incluir la concentración del límite de cuantificación como una de las 5 soluciones estándares de la curva de calibración y adicionar una solución con la concentración correspondiente al límite de detección para evaluar la señal a la hora de definir el límite de reporte.

Nota 4: El orden de elución de los aniones, es el siguiente: fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, ortofosfato y sulfato. En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

11.1.1. Preparación de la fase móvil:

Diluir 10 veces la solución de elución concentrada 8.2 con agua 8.1 (usar agua 8.1 preparada en el día). Filtrar por vacío con filtro de 0,45 µm. Rellenar el reservorio para la fase móvil y el reservorio de enjuague del inyector con agua 8.1.

11.1.2. Encendido del equipo:

Seguir las instrucciones de operación indicadas en el instructivo de uso para el cromatógrafo (INE 104) para encendido y manejo del mismo.

Ajustar a las siguientes condiciones operativas:

T horno de columna = 40 °C

T detector = 43 °C

Ganancia del Detector = 0,1 o 1,0 (según matriz analizada, ejemplo 0,1 para agua de lluvia y 1,0 para efluentes industriales o aguas naturales en las que se prevea mayor concentración de aniones.)

Respuesta: 1 sec

Flujo de bombeo de fase móvil = 1,1 mL/min

LC stop time 18:00 min (verificar que todos los picos salgan en ese tiempo)

Tipo de cartucho (Cartridge type): 312

Concentración (Concentration): 14,0 meq/L

Tiempo de demora de la inyección (Injection delay time): 4,5 min

Intervalo de cambio del supresor (Suppressor switching interval): 23 min

Tiempo de regeneración del supresor (Regeneration time): 8,8 min

Nota 5: Cuando el equipo alcanza las condiciones de medida indica LC Ready.

- 11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 5000 $\mu\text{V}/\text{min}$ y no posea un ruido superior a 50.00 μV . Estos parámetros se chequean desde el software con el test del "Baseline check". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.
- 11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 μm de tamaño de poro.
- 11.3. Crear la secuencia de medición en el equipo (batch table) según el instructivo de uso del equipo INE 104, incluyendo los estándares, las muestras y los controles de calidad.
- 11.4. Si el área de cada anión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.1. Si el área de algún anión es mayor a la correspondiente al último punto de la curva de calibración para ese anión proceder a diluir la muestra con agua 8.1 (registrar las diluciones realizadas en el RIN 41) o alternativamente realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.
- 11.5. Si la línea de base de la muestra es muy inestable, por ejemplo por la presencia de altas concentraciones de aniones orgánicos que hacen dudar de la cuantificación de algún anión (especialmente cloruro y fluoruro) verificar su concentración por dilución o por adición de una cantidad conocida del anión de interés.
- 11.6. Luego de finalizado el análisis apagar el cromatógrafo según el instructivo INE 104.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.
- 12.2. Calcular en caso de ser necesario los factores de dilución correspondientes a las muestras analizadas.
- 12.3. Calcular la concentración de cada anión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X, \text{ mg/L} = \frac{(A - O) \times \text{FD}}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del anión de interés

A: corresponde a la área o altura del pico del anión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

Nota 6: Estos cálculos son realizados por el software del equipo una vez que se ingresan las concentraciones de los estándares de calibración y los factores de dilución de las muestras.

- 12.4. Calcular la recuperación de la adición de las muestras fortificadas según:

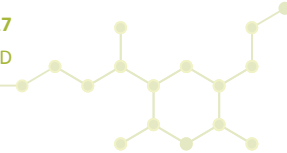
$$\% \text{ recuperación de la adición} = \frac{(X_f - X)}{S} \times 100$$

donde:

X_f : corresponde a la cantidad de analito en la muestra fortificada (mg)

X: corresponde a la cantidad de analito en la muestra sin fortificar (mg)

S: corresponde a la cantidad de analito en el volumen de estándar adicionado (mg)



- 12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada anión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.
- 12.6. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: “Manual de Control de Calidad Analítico”, Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 7: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias. Ver 13.4.

Nota 8: Los datos de área o altura de pico y tiempo de retención se obtienen del reporte de la corrida generado en el software del equipo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. El coeficiente de correlación de la curva utilizada deberá ser $R^2 \geq 0,99$ y la regresión de los puntos de calibración en la curva deberá estar dentro del $\pm 10 \%$ del valor real de concentración del estándar.
- 13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar de concentración similar a la mitad del rango de la curva, preparado desde una fuente independiente a la utilizada para la construcción de la curva (registrar en el RIN 41). Podrá utilizarse una solución de control interno o un material de referencia. La recuperación del valor de concentración real deberá estar dentro del $\pm 15 \%$, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.
- 13.3. **Control de recuperación de la matriz fortificada:** Fortificar una de cada veinte muestras o por lo menos una por batch, con un volumen conocido de una solución estándar de manera que el agregado no aumente el volumen más del 5 % de la toma de muestra fortificada y de manera que la concentración final este dentro del rango de calibración del equipo de lo contrario diluir la muestra fortificada para llevarla al rango de calibración. Procesar la muestra fortificada a través de toda la metodología (registrar la adición en RIN 41). La recuperación del analito agregado deberá estar entre 85 - 115 % del valor agregado, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.
- 13.4. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una de cada veinte muestras, o por lo menos un duplicado por batch. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un Rango Normalizado de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.
- 13.5. **Control de blancos:** la concentración de los analitos en la solución blanco deberá estar por debajo de la mitad del límite de reporte (siendo el límite de reporte el Límite de Detección/Cuantificación según el caso).

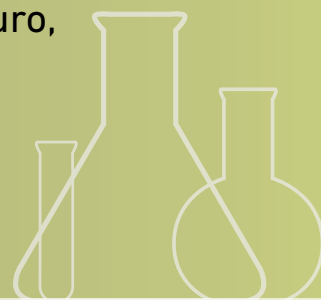
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4110 B Ion chromatography with chemical suppression of eluent conductivity pp.4-5 a 4-7.
- 14.2. Manuales del Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper (1404 SHIc 05242-51)



4030UY

Determinación de Aniones Inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales



Método Cromatografía Iónica (HPLC)

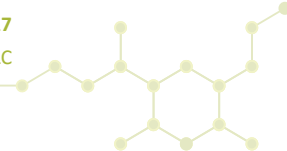
Elaborado - G. Medina

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales.
- 1.2. Los límites de detección de éste método son fluoruro 0,05 mg/L, nitrato 0,1 mg/L, fosfato 0,6 mg/L, cloruro 0,01 mg/L y sulfato 0,2 mg/L. Los límites de cuantificación son fluoruro 0,2 mg/L, nitrato 0,5 mg/L, fosfato 0,9 mg/L, cloruro 0,06 mg/L y sulfato 1,1 mg/L. Para el caso de efluentes industriales, los límites estarán determinados según la matriz.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos.” (1017UY)
- 2.6. Instructivo de uso del HPLC Shimadzu (INE 45)
- 2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto Precisa, de resolución 0,001 g (INE 06).
- 2.8. Instructivo de uso de balanza analítica Sartorius, de resolución 0,00001 g (INE 07).
- 2.9. Instructivo de uso de agua Milli Q (INE 28)
- 2.10. Instructivo de uso de baño con ultrasonido Branson Modelo 3510 (INE 69)
- 2.11. Instructivo de uso de pHmetro INE 10, INE 25 e INE 98
- 2.12. Ruta de análisis (RIN 02)
- 2.13. Planilla “Planilla de Datos de Preparación de estándares” (RIN 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los aniones de interés son separados según su afinidad en una columna de intercambio aniónico, en un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC). La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los aniones de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma, con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. El agregado de metanol para la preparación en los reactivos debe realizarse bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector será una interferencia. Por ejemplo altas concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación de fluoruro y cloruro.
- 5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno o polipropileno de 0,5 L de capacidad de cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Si se va a determinar nitrato y/o fosfato, el frasco debe ser lavado sin detergente y se debe realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para la determinación de sulfato, fluoruro y cloruro, el tiempo de análisis es de hasta 28 días manteniendo la muestra a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Cromatógrafo líquido de alta performance, marca Shimadzu (INE 45), compuesto por:
 - Bomba pistón (LC-10AT)
 - Horno para Columna (CTO-10A)
 - Inyector con loop de 100 µL
 - Detector de conductividad (CDD-6A)
 - Precolumna (opcional) y columna aniónica tipo Hamilton PRP-X100, tamaño de partícula 10 µm, diámetro interno 4,1 mm, largo 15 cm ó equivalente.
- 7.2. Equipo de ultrasonido para desgasificar el eluente o método de desgasificación equivalente.
- 7.3. Balanza analítica de precisión de al menos 0,1 mg.
- 7.4. Analizador de iones.
- 7.5. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm
- 7.6. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.
- 7.7. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.
- 7.8. Agitador magnético y barras agitadoras.
- 7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.
- 7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.
- 7.11. Jeringa de 250 µL de vidrio, marca SGE o similar.

8. REACTIVOS

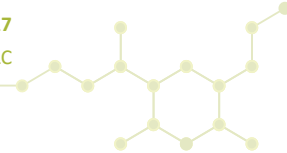
- 8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución stock de eluente concentrado: disolver 2.75 g de ácido p-hidroxibenzoico (C₇H₆O₃ Nro. CAS 99-96-7 PA) en 125 mL de metanol (CH₄O Nro. CAS 67-56-1 calidad HPLC), diluir a 1000 mL con agua HPLC. Almacenar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta 3 meses.
- 8.3. Soluciones buffer de pH 4, 7 y 10 para la calibración del electrodo.
- 8.4. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta, pesar con precisión de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua HPLC a 50 mL en tubo de plástico de 50 mL. Preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 "Planilla de Datos de Preparación de estándares".

| Anión | Sal | Peso (g) |
|----------|--|----------|
| Fluoruro | KF Nro. CAS 7789-23-3 | 0,1529 |
| Cloruro | NaCl Nro. CAS 7647-14-5 | 0,0824 |
| Nitrato | NaNO ₃ Nro. CAS 7631-99-4 | 0,0685 |
| Fosfato | KH ₂ PO ₄ Nro. CAS 7778-77-0 | 0,0716 |
| Sulfato | K ₂ SO ₄ Nro. CAS 7778-80-5 | 0,0910 |

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Las determinaciones en aguas de lluvia son a niveles de trazas, por lo que hay que extremar cuidados para evitar la contaminación.
- 9.2. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.
- 9.3. El resto del material debe ser lavado por enjuague con agua HPLC sin utilizar ácidos ni detergentes. En caso



de contener material sólido adherido usar solventes orgánicos para removerlos y luego enjuagar tres veces con agua HPLC.

- 9.4. Las muestras deben filtrarse en el sector destinado para aniones. Tener en cuenta la posibilidad de contaminación cruzada en caso de trabajar en zonas de tratamiento de muestras, donde se utilizan ácidos fuertes.
- 9.5. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 μm de tamaño de poro y desairearse previo a su introducción en el HPLC.
- 9.6. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 μm de tamaño de poro, previo a su introducción en el HPLC.
- 9.7. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio, especialmente con muestras digeridas para metales.
- 9.8. Es recomendable identificar las columnas según la matriz analizada.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar por lo menos 3 soluciones estándares conteniendo mezcla de los aniones que se quieren determinar por dilución de la solución stock de estándares con agua HPLC. Por ejemplo para aguas de lluvia realizar una curva entre 0,1 y 2 mg/L, y para efluentes industriales entre 0,5 y 10 mg/L. Realizar un estándar con la menor concentración de interés para cada anión.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de precisión 0,1 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

- 10.2. Inyectar los estándares en el loop de 100 μL con la jeringa de 250 μL completamente cargada, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Identificar el pico correspondiente a cada anión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada anión.
- 10.3. El orden de elución de los aniones, es el siguiente: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato.
En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.
- 10.4. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

- 11.1.1. Preparación del eluente o fase móvil: diluir 5 veces la solución stock concentrada con agua HPLC, ajustar el pH entre 8,55 y 8,61 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N (aproximadamente 5 mL por litro de fase móvil). Filtrar por vacío con filtro de 0,45 μm . Con el vacío conectado desgasificar por lo menos durante 15 min en ultrasonido, hasta no detectar visualmente burbujas de aire en la solución.
- 11.1.2. Encendido y estabilización del equipo:
Seguir las instrucciones de operación indicadas en el equipo para encendido y manejo del mismo. Ajustar a las siguientes condiciones operativas:
T horno de columna = 40 °C
T detector = 43 °C
Ganancia del Detector = 1,0 (el equipo podrá ser utilizado con ganancia 0,1 siempre y cuando la matriz de la muestra lo permita)
Flujo = 2,0 mL/min
P máx. = a la presión máxima que admite la columna según los datos del fabricante, 1500 psi para la columna utilizada según este procedimiento.
Polaridad: +
- 11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 1000 mV/min. Este parámetro se chequea desde el software con el test del "slope". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.

- 11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 µm de tamaño de poro.
- 11.3. Inyectar las muestras en el loop de 100 µL con el inyector en posición "LOAD", con una jeringa de 250 µL, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Una vez cargado el loop, correr el inyector hasta la posición INYECT.
- 11.4. Si el área de cada anión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.4. Si el área de algún anión es mayor al mayor punto de la curva de calibración para ese anión proceder a diluir la muestra con agua HPLC o alternatively realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.
- 11.5. Si la línea de base de la muestra es muy inestable, por ejemplo por la presencia de altas concentraciones de aniones orgánicos que hacen dudar de la cuantificación de algún anión (especialmente cloruro y fluoruro) verificar su concentración por dilución o por adición de una cantidad conocida del anión de interés.
- 11.6. Luego de finalizado el análisis: apagar el horno y el detector; enjuagar el sistema dejando circular la fase móvil hasta que alcance temperatura ambiente y luego apagar la bomba, según INE 45.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.
- 12.2. Graficar el área o altura de cada ión en particular, en función de la concentración calculada en 13.1. La curva de mejor ajuste corresponde a una recta.
- 12.3. Calcular la concentración de cada anión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X, \text{ mg/L} = \frac{(A - O) \times FD}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del anión de interés

A: corresponde al área o altura del pico del anión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

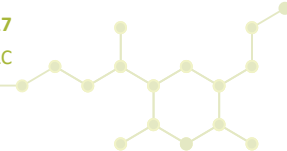
FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

- 12.4. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada anión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.
- 12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 3: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** analizar un material de referencia certificado externo simultáneamente con el set de muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.
- 13.2. **Control de la precisión:** se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una cada cinco muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un RSD de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.



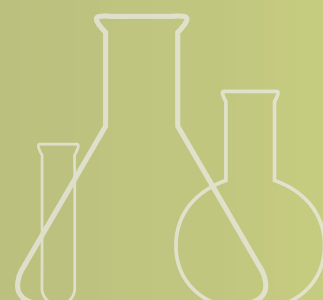
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4110 A Determination of anions by ion chromatography y 4110 C Single Column ion chromatography with direct conductivity detection pp.4-5 y 4-8 a 4-9.
- 14.2. Manual de Columna PRP x 100 Hamilton.



4031UY

Determinación de cianuro total en aguas
y efluentes industriales



Método espectrofotométrico

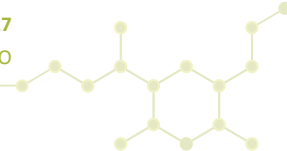
Elaborado - G. Medina

Modificado - S. Andrade

Revisado - N. Barboza

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de cianuro en aguas y efluentes industriales, en concentraciones mayores de 0,005 mg/L. El límite de detección es de 0,002 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 160 A (INE 39, 40)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza Precisa de plato abierto (INE 06)
- 2.7. Ruta de análisis (RIN 04 A y B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión cianuro (CN^-) puede encontrarse en agua como ión libre o formando complejos tanto orgánicos como inorgánicos de variada estabilidad. La determinación de cianuro total implica la destilación previa de la muestra en medio ácido para disociar los complejos y eliminar posibles interferencias
- 3.2. El ácido cianhídrico (HCN), liberado de la muestra acidificada por destilación, es arrastrado por una corriente de aire y recogido en una solución de hidróxido de sodio. El ión cianuro en el destilado alcalino es convertido a cloruro de cianógeno (CNCl) por reacción con cloramina T a pH entre 5 y 6. Este compuesto formado, en presencia del reactivo ácido barbitúrico - piridina desarrolla un complejo de coloración rosada que se determina espectrofotométricamente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Se deberá trabajar en campana de extracción.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.4. El ácido cianhídrico, forma molecular en la que se presenta el ion cianuro, es un gas muy tóxico. La relación CN^- - HCN depende del pH, por ello todas las soluciones de cianuro se deben mantener a pH básico. Manejar las muestras y estándares con sumo cuidado.
- 4.5. El cloruro de cianógeno es un gas altamente tóxico, evitar inhalación y trabajar en campana durante el desarrollo de color.
- 4.6. La piridina es un reactivo altamente inflamable. Es nocivo por inhalación, contacto con la piel o ingestión.
- 4.7. El ácido clorhídrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.
- 4.8. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.
- 4.9. El proceso de destilación del ión cianuro se debe realizar en campana de extracción. Asegurarse previo al agregado de ácido al matraz de destilación, que el vacío esté operando correctamente arrastrando los gases que puedan formarse durante la destilación hacia los tubos recolectores.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Las interferencias posibles son eliminadas o reducidas al mínimo con la destilación.
- 5.2. Agentes oxidantes como el cloruro (Cl^-), pueden llegar a destruir la mayoría de los grupos CN^- , durante el almacenamiento y su posterior manipulación.
- 5.3. Para muestras que contengan concentraciones mayores a 0,5 $\mu\text{g/L}$ de formaldehído, solo podrá determinarse CN^- libre ya que en condiciones de destilación puede haber pérdidas de cianuro.
- 5.4. Sulfocianuro (SCN^-) reacciona con cloramina-T, creando una interferencia positiva. Para verificar la presencia de sulfocianuro se enmascara al ión cianuro con formaldehído.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de 1 L de capacidad. Ajustar a $\text{pH} > 12$ inmediatamente luego de extraída la muestra, con NaOH 10 M. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$), mantener en la oscuridad.
- 6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Tiempo máximo recomendado para su análisis 14 días.

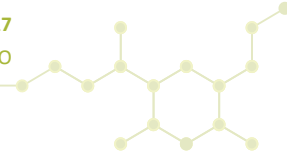
7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de destilación: matraz de destilación, tubo de vertido, refrigerante, 2 tubos receptores de vapores, 2 barboteadores, kitasato, trampa de agua.
- 7.2. Manta eléctrica (Electromante o similar).
- 7.3. Espectrofotómetro Shimadzu 160-A. Longitud de onda 575 - 582 nm (INE 39, 40).
- 7.4. Cubetas de vidrio o cuarzo de 1 cm de camino óptico.
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-10 mL).
- 7.6. Probetas de 100, 250 y 500 mL.
- 7.7. Matraces aforados con tapa de 25, 50 y 100 mL.
- 7.8. Balanza de resolución 0,001 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 M (40 g/L): disolver 20 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua.
- 8.3. Hidróxido de sodio 0,04 M: diluir 8 mL de hidróxido de sodio 1 M en 200 mL de agua destilada.
- 8.4. Solución de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7791-18-6): disolver 127,5 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 250 mL de agua destilada.
- 8.5. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) (1+1): diluir al medio ácido sulfúrico concentrado (95-97%, $d = 1,84 \text{ g/mL}$).
- 8.6. Ácido sulfámico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ Nro. CAS 5329-14-6) PA en polvo.
- 8.7. Carbonato de plomo (PbCO_3 Nro. CAS 598-63-0).
- 8.8. Cloramina-T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNaNO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7080-50-4): disolver 1,0 g de cloramina-T en 100 mL de agua. Prepararla semanalmente y almacenar en el refrigerador.
- 8.9. Solución control de cianuro 1000 mg/L: disolver 1,6 g de NaOH y 2,51 g de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial Merck N° 1.19533 o similar.
- 8.10. Solución stock de cianuro 100 mg/L: disolver 0,16 g de NaOH y 0,251 g de cianuro de sodio (NaCN) en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial AccuStandard WC-CN-1X-5 o similar.
- 8.11. Solución estándar de cianuro 10 mg/L: tomar 1000 μL de la solución stock de cianuro y llevar a 10 mL con hidróxido de sodio 0,04 M en tubo de plástico descartable.
- 8.12. Reactivo piridna-ácido barbitúrico: pesar 15 g de ácido barbitúrico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 67-52-7) en un Erlenmeyer de 250 mL y agregar suficiente agua como para mojar el ácido. Agregar 75 mL de piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ Nro. CAS 110-86-1) y mezclar. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico conc. (HCl Nro. CAS 7647-01-0), mezclar y enfriar a temperatura ambiente. Diluir con agua a 250 mL. Este reactivo es estable por aproximadamente 6 meses si se conserva en frasco color ámbar y en refrigerador. Descartar si la solución se torna marrón oscuro o aparece precipitado.
- 8.13. Buffer de acetato: disolver 410 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 6131-90-4) en 500 mL de agua. Agregar ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ Nro. CAS 64-19-7) hasta ajustar el pH a 4,5, aproximadamente 500 mL.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Para evitar pérdidas del HCN que afecten la recuperación del ión cianuro se debe controlar que el vacío funcione correctamente durante todo el proceso de destilación, aproximadamente 1 burbuja por segundo, en el recipiente de destilación.
- 9.2. Preparar la curva de calibración cada vez que se realice la determinación de las muestras ya que el reactivo piridina-barbitúrico es muy inestable.
- 9.3. Durante el desarrollo de color el pH de reacción debe estar comprendido entre 5 y 6, en caso contrario proseguir según lo especifica el punto 11.5.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Curva de calibración:

- 10.1. En matraces aforados de 25 mL pipetear 25, 50, 75, 100 y 250 μL de la solución estándar de cianuro de 10 mg/L. Las concentraciones de los estándares quedarán comprendidas en el rango de 0,01 a 0,1 mg/L de CN. Realizar un blanco de reactivos.
- 10.2. Agregar 400 μL de hidróxido de sodio 1 M y aproximadamente 10 mL de agua. Agitar para mezclar. Adicionar luego 2 mL del buffer de acetato y 1 mL de cloramina T, mezclar por inversión 2 veces y dejar reposar exactamente 2 minutos.
- 10.3. Agregar 2,5 mL del reactivo ácido barbitúrico-piridina. Llevar a 25 mL con agua, mezclar por inversión y dejar reposar 10 minutos previo a la determinación espectrofotométrica. Esta última se realiza a 580 nm contra el blanco de reactivos preparado.
- 10.4. Graficar absorbancia vs. concentración de ión cianuro en mg/L.

Nota 2: Previo a la determinación espectrofotométrica se puede correr el espectro del estándar de mayor concentración y realizar las medidas en el pico exacto de máxima absorción, el mismo estará comprendido entre 575 - 582 nm.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Destilación de la muestra.

- 11.1.1. Homogeneizar adecuadamente la muestra. Tomar 500 mL o una alícuota de la misma, tal que el contenido de CN₂ en la solución final donde se recoge el destilado esté en el rango de la curva de calibración (0,01 a 25 mg/L). La toma se coloca en el matraz de destilación y si es menor de 500 mL se lleva a dicho volumen con agua destilada.
- 11.1.2. Colocar en los tubos de recolección aproximadamente 40 mL de hidróxido de sodio 1 M, dicho volumen se alcanza en el cambio de diámetro del tubo. Si se sospecha generación de ácido sulfhídrico desde el matraz de destilación, agregar a cada tubo recolector 50 mg de carbonato de plomo (PbCO_3) para precipitar el sulfuro.
- 11.1.3. Armar el equipo de destilación (ver anexo I), suministrar agua al refrigerante y proceder a hacer vacío. Ajustar el burbujeo en el matraz de destilación tal que entre 1 burbuja de aire por segundo. Mantener dicho flujo de aire durante toda la destilación.
- 11.1.4. Agregar 2 g de ácido sulfámico en el matraz de destilación a través del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada.
- 11.1.5. Agregar 50 mL de ácido sulfúrico (1+1) en el matraz de destilación a través del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada. Dejar mezclar por acción del burbujeo aproximadamente 2 minutos.
- 11.1.6. Agregar 20 mL de solución de cloruro de magnesio en el matraz de destilación a través de del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada. Dejar mezclar por acción del burbujeo aproximadamente 2 minutos.
- 11.1.7. Encender la manta calefactora. Esperar que alcance la ebullición, mantener 1 hora controlando en todo momento el flujo de aire que recorre el sistema. Este punto es crítico para que no se produzcan pérdidas por el sistema, si la ebullición es demasiado violenta se puede aumentar el vacío a 2 burbujas de aire por segundo, para evitar que se reabsorba la muestra por el tubo de entrada de aire.
- 11.1.8. Finalizada la destilación apagar la manta calefactora y dejar el sistema con arrastre de aire hasta alcanzar la temperatura ambiente.

- 11.1.9. Retirar los tubos de recolección de cianuro, y transvasar cuantitativamente ambos contenidos a un matraz de 100 mL, enjuagar al menos una vez con agua y recogerla en el matraz junto con la muestra. Registrar el volumen final obtenido. El destilado está listo para proseguir con la determinación.

Nota 3: Las tomas de volumen de muestra, pueden realizarse al peso, si se asume densidad de 1 g/mL. En caso de no cumplimiento, se deberá tener en cuenta para el cálculo correspondiente. En caso de fortificar muestras, registrar la toma y el volumen final para el cálculo correspondiente.

- 11.2. Colocar en un matraz aforado de 25 mL una alícuota de la muestra tal que la concentración resultante esté en el rango de medida. La toma puede estar comprendida entre 25 µL y 19 mL.
- 11.3. Adicionar 2 mL del buffer de acetato y 1 mL de cloramina T, mezclar por inversión 2 veces y dejar reposar exactamente 2 minutos.
- 11.4. Agregar 2,5 mL del reactivo ácido barbitúrico-piridina. Llevar a 25 mL con agua, mezclar por inversión y dejar reposar 10 minutos previo a la determinación espectrofotométrica. Esta última se realiza a 580 nm contra el blanco de reactivos preparado.
- 11.5. Corroborar que el pH resultante esté comprendido entre 5 y 6. En caso contrario ajustarlo con hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico luego del agregado del buffer.

Nota 4: Si es necesario llegar a límites inferiores de 0,01 mg/L de cianuro, se puede realizar la determinación de las muestras en matraces de 50 mL, donde la toma de la misma puede llegar a 38 mL.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. La curva de mejor ajuste al graficar absorbancia en función de la concentración de cianuro en mg/L es una recta.

$$\text{Curva de calibración: Abs.} = a \times \text{mg CN}^{\cdot}/\text{L} + b$$

donde:

a y b: corresponden a los coeficientes de la recta.

- 12.2. La concentración de cianuro en la muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Cianuro, mg CN}^{\cdot}/\text{L} = (\text{Abs.} - b)/a \times V_{f_1}/T_1 \times V_{f_2}/T_2$$

donde:

a y b: corresponden a los coeficientes de la recta.

V_{f_1} : corresponde al volumen en mL del matraz donde se realizó el desarrollo de color.

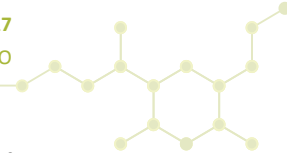
T_1 : corresponde a la toma de muestra en mL ensayada en el desarrollo de color.

V_{f_2} : corresponde al volumen en mL del matraz donde se recogió el destilado.

T_2 : corresponde a la toma de muestra en mL ensayada en la destilación.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de recuperación:** Se debe realizar la destilación y determinación de una solución control o material de referencia de la matriz correspondiente a la muestra analizada. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, según gráfico de control correspondiente.
- 13.2. Para muestras que presenten comportamiento anormal, se deberá fortificar la muestra y realizar el destilado. Calcular el % de recuperación según control de calidad analítico.
- 13.3. Cuando el resultado de 13.1 y 13.2 no se encuentren dentro de los límites de tolerancia, se deben estudiar las posibles causas que pueden haber perjudicado la recuperación del control. En caso que la causa asignable pueda perjudicar la recuperación de las muestras se debe repetir el análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico).



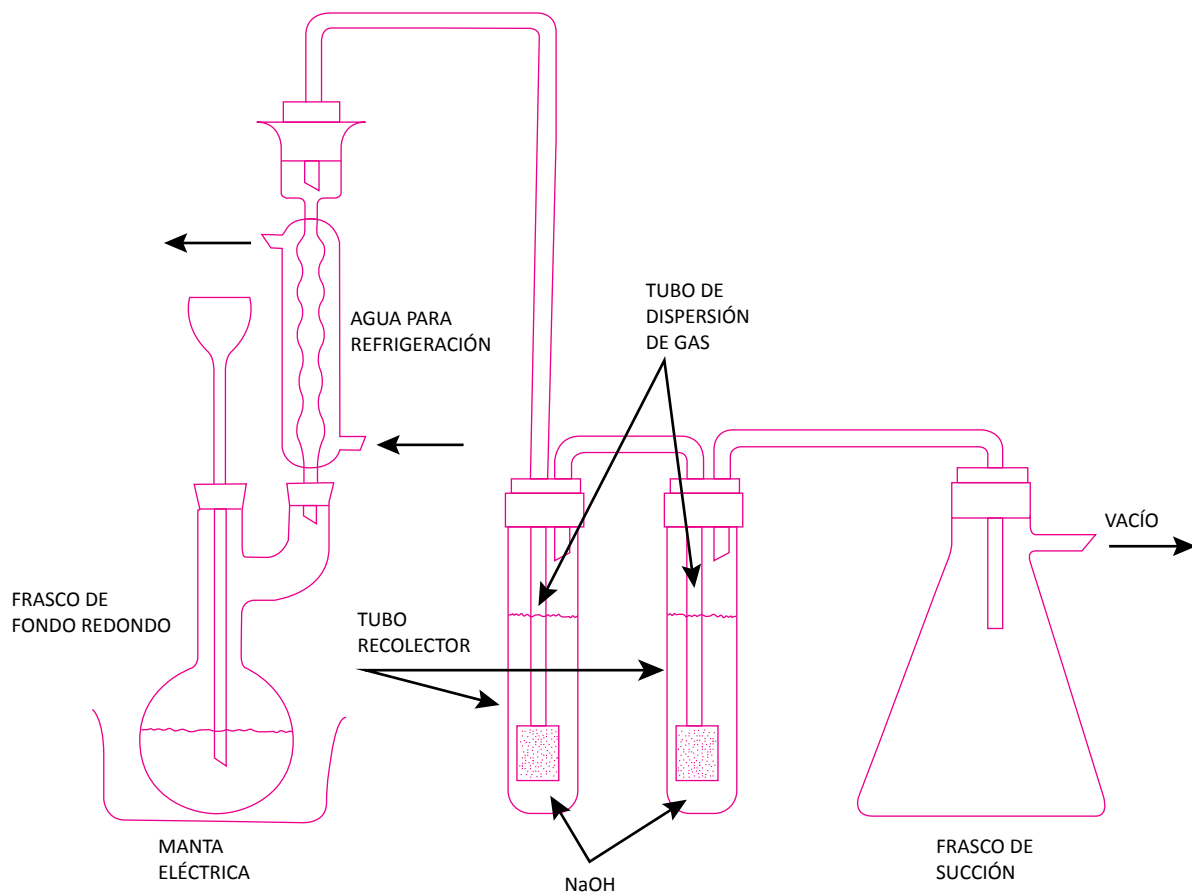
- 13.4. **Control de exactitud:** Se debe realizar la determinación de una solución control o material de referencia. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, según gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, evaluar la repetición del análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar un análisis completo por duplicado cada tres muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites según gráfico de control correspondiente. (Ver Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.6. **Blanco de destilado:** se deberá analizar un blanco que incluya toda las etapas analíticas (destilación y desarrollo de color). Se realiza 1 cada 10 muestras, mínimo 1 por corrida. En caso de contar con grafico de blancos, registrar los valores obtenidos, según fecha de análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 CN- C Total cyanide after distillation y 4500 CN- E Colorimetric Method pp. 4-39 a 4-40 y pp. 4-41 a 4-43.

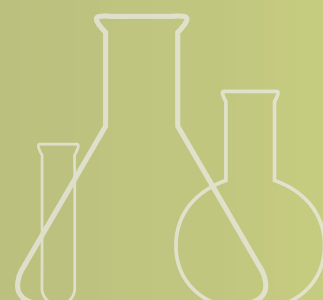
ANEXO I

Diagrama del Equipo de Destilación



4032UY

Determinación de cianuro libre en aguas
y efluentes industriales



Método espectrofotométrico

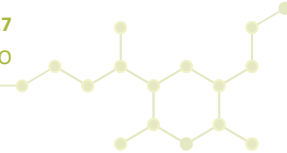
Elaborado - G. Medina

Modificado - S. Andrade

Revisado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de cianuro en aguas y efluentes industriales, en concentraciones mayores a 0,02 mg/L. El límite de detección es de 0,007 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 160 A (INE 39, INE 40)
- 2.6. Instructivo de uso de balanza Precisa de plato abierto (INE 06)
- 2.7. Ruta de análisis código (RIN 04 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión cianuro libre, es convertido a cloruro de cianógeno (CNCl) por reacción con cloramina-T a pH entre 5 y 6. Este compuesto formado, en presencia del reactivo ácido barbitúrico-piridina desarrolla un complejo de coloración rosada que se determina espectrofotométricamente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Se deberá trabajar en campana de extracción.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.4. El ácido cianhídrico, forma molecular en la que se presenta el ion cianuro, es un gas muy tóxico. La relación $CN^- - HCN$ depende del pH, por ello todas las soluciones de cianuro se deben mantener a pH básico. Manejar las muestras y estándares con sumo cuidado.
- 4.5. El cloruro de cianógeno es un gas altamente tóxico evitar inhalación y trabajar en campana durante el desarrollo de color.
- 4.6. La piridina es un reactivo altamente inflamable. Es nocivo por inhalación, contacto con la piel o ingestión.
- 4.7. El ácido clorhídrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Sulfocianuro (SCN^-) reacciona con cloramina-T, creando una interferencia positiva. Para verificar la presencia de sulfocianuro se enmascara al ión cianuro con formaldehído.
- 5.2. El ión sulfuro afecta adversamente la colorimetría.
- 5.3. Agentes oxidantes como Cl_2 , pueden llegar a destruir la mayoría de los grupos CN^- , durante el almacenamiento y su posterior manipulación.
- 5.4. Otras posibles interferencias incluyen todos aquellos compuestos que pueden contribuir a dar color o turbidez a las muestras. En dicho caso tratar la muestra por filtración o centrifugación previo al análisis.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio, polietileno o polipropileno de 1 L de capacidad. Ajustar a $pH > 12$ inmediatamente luego de extraída la muestra, con NaOH 10 M. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$), mantener en la oscuridad.
- 6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Tiempo máximo recomendado para su análisis 14 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro Shimadzu 160-A. Longitud de onda 575 - 582 nm (INE 39, 40).
- 7.2. Cubetas de vidrio o cuarzo de 1 cm de camino óptico.
- 7.3. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL).
- 7.4. Matraces aforados con tapa de 25 y 50 mL.
- 7.5. Balanza de resolución 0,001 g (Precisa 500M-2000C).

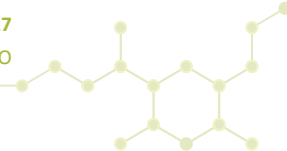
8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 M (40 g/L): disolver 20 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua.
- 8.3. Hidróxido de sodio 0,04 M: diluir 8 mL de hidróxido de sodio 1 M en 200 mL de agua destilada.
- 8.4. Cloramina-T ($C_7H_7ClNaNO_2 \cdot 3H_2O$ Nro. CAS 7080-50-4): disolver 1,0 g de cloramina-T en 100 mL de agua. Prepararla semanalmente y almacenar en el refrigerador.
- 8.5. Solución control de cianuro 1000 mg/L: disolver 1,6 g de NaOH y 2,51 g de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial Merck Nº 1.19533 o similar.
- 8.6. Solución stock de cianuro 100 mg/L: disolver 0,16 g de NaOH y 0,251 g de NaCN en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial AccuStandard WC-CN-1X-5 o similar.
- 8.7. Solución estándar de cianuro 10 mg/L: tomar 1000 µL de la solución stock de cianuro y llevar a 10 mL con hidróxido de sodio 0,04 M en tubo de plástico descartable.
- 8.8. Reactivo piridina-ácido barbitúrico: pesar 15 g de ácido barbitúrico ($C_4H_4N_2O_3$ Nro. CAS 67-52-7) en un Erlenmeyer de 250 mL y agregar suficiente agua como para mojar el ácido. Agregar 75 mL de piridina (C_5H_5N Nro. CAS 110-86-1) y mezclar. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico conc. (HCl Nro. CAS 7647-01-0), mezclar y enfriar a temperatura ambiente. Diluir con agua a 250 mL. Este reactivo es estable por aproximadamente 6 meses si se conserva en frasco color ámbar y en refrigerador. Descartar si la solución se torna marrón oscuro o aparece precipitado.
- 8.9. Buffer de acetato: Disolver 410 g de acetato de sodio trihidratado ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ Nro. CAS 6131-90-4) en 500 mL de agua. Agregar ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7) hasta ajustar el pH a 4,5, aproximadamente 500 mL.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Preparar la curva de calibración cada vez que se realice la determinación de las muestras ya que el reactivo piridina-barbitúrico es inestable.
- 9.2. Durante el desarrollo de color el pH de reacción debe estar comprendido entre 5 y 6, en caso contrario proseguir según lo especifica el punto 11.2.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Curva de calibración:

- 10.1. En matraces aforados de 25 mL pipetear 25, 50, 75, 100 y 250 μL de la solución estándar de cianuro de 10 mg/L. Las concentraciones de los estándares quedarán comprendidas en el rango de 0,01 a 0,1 mg/L de CN. Realizar un blanco de reactivos.
- 10.2. Agregar 400 μL de hidróxido de sodio 1 M y aproximadamente 10 mL de agua. Agitar para mezclar. Adicionar luego 2 mL del buffer de acetato y 1 mL de cloramina T, mezclar por inversión 2 veces y dejar reposar exactamente 2 minutos.
- 10.3. Agregar 2,5 mL del reactivo ácido barbitúrico-piridina. Llevar a 25 mL con agua, mezclar por inversión y dejar reposar 10 minutos previo a la determinación espectrofotométrica. Esta última se realiza a 580 nm contra el blanco de reactivos preparado.
- 10.4. Graficar absorbancia vs concentración de ión cianuro en mg/L.

Nota 2: Previo a la determinación espectrofotométrica se puede correr el espectro del estándar de mayor concentración y realizar las medidas en el pico exacto de máxima absorción, el mismo estará comprendido entre 575 - 582 nm.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Colocar en un matraz aforado de 25 mL una alícuota de la muestra tal que la concentración resultante esté en el rango de medida. La toma puede estar comprendida entre 25 μL y 19 mL.
- 11.2. Adicionar 2 mL del buffer de acetato y 1 mL de cloramina-T, mezclar por inversión 2 veces y dejar reposar exactamente 2 minutos.
- 11.3. Agregar 2,5 mL del reactivo ácido barbitúrico-piridina. Llevar a 25 mL con agua, mezclar por inversión y dejar reposar 10 minutos previo a la determinación espectrofotométrica. Esta última se realiza a 580 nm contra el blanco de reactivos preparado.
- 11.4. Corroborar que el pH resultante esté comprendido entre 5 y 6. En caso contrario ajustarlo con hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico luego del agregado del buffer

Nota 3: Si es necesario llegar a límites inferiores de 0,01 mg/L de cianuro, se puede realizar la determinación de las muestras en matraces de 50 mL, donde la toma de la misma puede llegar a 38 mL.

12 ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. La curva de mejor ajuste al graficar absorbancia en función de la concentración de cianuro en mg/L es una recta.

$$\text{Curva de calibración: Abs.} = a \times \text{mg CN}^{\cdot}/\text{L} + b$$

donde:

a y b: corresponden a los coeficientes de la recta.

- 12.2. La concentración de cianuro en la muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Cianuro, mg CN}^{\cdot}/\text{L} = (\text{Abs.} - b)/a \times V_f/T$$

donde:

a y b: corresponden a los coeficientes de la recta.

V_f: corresponde al volumen en mL del matraz donde se realizó el desarrollo de color.

T: corresponde a toma de muestra en mL.

Nota 4: En caso de realizar tomas en peso, se asume densidad de la muestra de 1 g/mL. Si esto no llegara a cumplirse, deberán corregirse los pesos, según densidades correspondientes.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

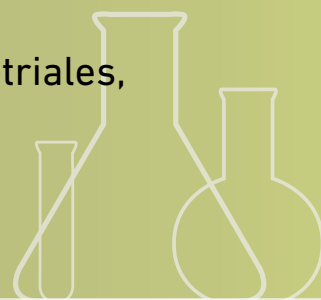
- 13.1. **Control de exactitud:** Se debe realizar el análisis de una solución control o material de referencia. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación que surgen a partir del gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, evaluar la repetición del análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico). En caso de detectar comportamientos anormales en las muestra, se deberá fortificar la muestra y calcular el porcentaje de recuperación según manual de control de calidad analítico.
- 13.2. **Control de precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado cada tres muestras, mínimo una serie por muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association. (APHA) (2005) Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 CN- E Colorimetric method pp. 4-41 a 4-43.

4051UY

Determinación de sulfuro en efluentes industriales,
en concentraciones superiores a 0,05 mg/L



Método potenciométrico – Medida directa

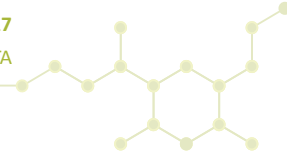
Elaborado - G. Medina

Modificado - N. Barboza

Revisado - N. Barboza

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinación de sulfuro en efluentes industriales, en concentraciones en el rango de 0,05 a 10 mg/L. El límite de detección es de 0,03 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RIN 10)
- 2.6. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118)
- 2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La determinación incluye todo el sulfuro presente como HS^- , H_2S y los sulfuros metálicos solubles, todos ellos son convertidos a S^{2-} con un buffer altamente alcalino y antioxidante. El S^{2-} obtenido es determinado por medida directa con el electrodo selectivo de plata /sulfuro, utilizando el electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), mediante una curva de calibración. Puede utilizarse también un electrodo combinado Ag/S^{2-} .
- 3.2. El electrodo de plata /sulfuro consiste de una membrana de sulfuro de plata unida al cuerpo electródico. Cuando la membrana está en contacto con una solución conteniendo los iones plata o sulfuro, se produce una diferencia de potencial a través de la misma. Dicho potencial depende de la actividad de los iones en solución y es determinado contra un potencial de referencia. El buffer alcalino y antioxidante utilizado produce una fuerza iónica alta y constante, por lo cual la actividad del sulfuro es directamente proporcional a la concentración del ión en solución.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El buffer alcalino y antioxidante contiene una elevada concentración de hidróxido de sodio (NaOH), es muy corrosivo, por lo cual no debe tomar contacto con la piel y los ojos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los sulfuros de mercurio y plomo son insolubles en las condiciones de medida, por lo que no pueden ser determinados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en recipientes de plástico de 250 mL de capacidad el cual debe contener previamente 125 mL de buffer antioxidante.
- 6.2. Evitar que quede cámara de aire en el recipiente. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0\text{ }^\circ\text{C}$). Proteger de la luz. Analizar antes 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).
- 7.2. Electrodo selectivo de plata /sulfuro (Orion 9416).
- 7.3. Electrodo de referencia Ag^+/AgCl (Orion 9002), con sus soluciones de relleno: cámara interna Orion 900002, cámara externa Orion 900003.
- 7.4. Alternativamente al 7.2 y 7.3, electrodo combinado Ag/S (Orion 9616BNW) con su solución de relleno 900062.
- 7.5. Agitador magnético.

- 7.6. Barras magnéticas recubiertas de teflón.
- 7.7. Vasos de Bohemia de 50 y 100 mL.
- 7.8. Matraz Erlenmeyer de 125 y 250 mL.
- 7.9. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL).
- 7.10. Pipeta automática calibrada de 1,0 mL.
- 7.11. Balanza de resolución 0,01 g.
- 7.12. Balanza de resolución 0,001 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desaireada para evitar posibles oxidaciones del ión sulfuro. Para desairear, calentar agua desionizada 8.1 a ebullición durante 15 minutos, enfriar y utilizar inmediatamente.
- 8.3. Buffer antioxidante de sulfuro: pesar 80 g de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), colocarlos en Erlenmeyer de 1000 mL, agregar 800 mL de agua desionizada y desaireada, agitar hasta disolver y dejar enfriar. Agregar 35 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y 67 g de EDTA disódica ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6), agitando para disolver, llevar a 1 L con agua desionizada y desaireada. Esta solución será incolora o poseerá un leve color amarillo pálido, descartar cuando se torna marrón oscuro. Guardar inmediatamente en frasco hermético y sin cámara de aire para evitar oxidaciones. Se puede almacenar en frascos de 125 mL, que deben acompañar los envases de muestreo.
- 8.4. Solución estándar de perclorato de plomo [$(Pb(ClO_4)_2)$ Nro. CAS 13453-62-8] 0,100M: Disolver 40,610 g de perclorato de plomo en agua y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Se puede utilizar la solución comercial Orion 948206.
- 8.5. Solución stock sulfuro aproximadamente 1300 mg/L: en Erlenmeyer de 250 mL disolver 25 g de sulfuro de sodio nohidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4) en 250 mL de agua desionizada y desaireada. Guardar en frasco de plástico con cierre hermético y sin cámara de aire. La validez de esta solución es de 6 meses.
- 8.6. Solución estándar de sulfuro aproximadamente 130 mg/L: en Erlenmeyer de 125 mL colocar 10 mL de la solución stock de sulfuro, agregar 50 mL de buffer antioxidante, mezclar y llevar a 100 mL con agua desionizada. Determinar su concentración exacta por titulación potenciométrica con perclorato de plomo 0,100 M, según procedimiento para determinación de sulfuro por titulación potenciométrica 4052UY.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

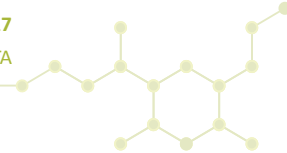
9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. La solución interna del electrodo de referencia $Ag^+ / AgCl$ (Orion 9002) debe estar a 2,5 cm por encima de la solución externa del mismo electrodo. La solución externa debe estar a 2,5 cm por encima de la superficie de la muestra.
- 9.2. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido por los electrodos. Dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente previo a la determinación. Durante la calibración y la medida de las muestras se debe trabajar a una temperatura ambiente constante.
- 9.3. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Si esto sucede colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.
- 9.4. El electrodo responde lentamente por debajo de 1 mg S^{2-}/L , en dicho caso dejar estabilizar la lectura de potencial 2 o 3 minutos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo.

- 10.1. Realizarlo siempre que sea necesario: electrodo en desuso durante un tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.
- 10.2. Conectar el electrodo de plata/sulfuro y el electrodo de referencia (cuando corresponda) al analizador de iones, enjuagar ambos electrodos con agua desionizada y secar con papel absorbente.



- 10.3. Colocar en un vaso de bohemia 20,00 mL de agua desionizada y 20,00 mL del buffer antioxidante, agregar 400 μ L de la solución estándar de sulfuro, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar los electrodos en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.
- 10.4. Colocar a la solución anterior 4,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez estable la medida.
- 10.5. Si la temperatura de medida está entre $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de -25 a -30 mV (verificar el rango para cada electrodo en el manual del instrumento). En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al manual de instrucciones del electrodo.

Nota 2: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí, en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 ppm de S^{2-} .

Curva de calibración.

- 10.6. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución estándar de sulfuro a una solución 1:1 de agua desionizada y buffer antioxidante. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar los rangos de concentración en la que ésta debe ser preparada.
- 10.7. Colocar 40 mL de agua desionizada y 40 mL del buffer antioxidante en un vaso de Bohemia de 125 mL; registrar el peso de dicha solución. (P_i)
- 10.8. Sumergir los electrodos en la solución y mezclar mediante agitación magnética.
- 10.9. Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de sulfuro, según el fin perseguido. Registrar el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y los sensores de los electrodos. Medir el voltaje cuando se establezca la medida.
- 10.10. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes de concentración exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como el potencial obtenido.
- 10.11. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Colocar directamente en el recipiente de muestreo una barra magnética y agitar suavemente. Sumergir los electrodos y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.
- 11.2. Determinar la densidad t el peso total de la muestra en el recipiente de muestreo, muestra + 125 mL de buffer. (V_f)

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Graficar el potencial registrado en mV en función del logaritmo decimal de la concentración de sulfuro.
- 12.2. La concentración de sulfuro para cada punto de la curva de calibración se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Sulfuro, mg/L} = \frac{V \text{ agregado} \times C \text{ estándar}}{(V \text{ agregado} + P_i/d)}$$

donde:

- V: agregado corresponde a la suma de todos los volúmenes agregado del estándar de sulfuro.
- C: estándar corresponde a la concentración del estándar de sulfuro que se adiciona en mg/L.
- P_i : corresponde al peso de la solución 1:1 de buffer y agua desionizada.
- d: corresponde a la densidad en g/mL de la solución 1:1 de buffer y agua desionizada.

12.3. Cuando la curva de mejor ajuste al graficar el logaritmo decimal de la concentración de sulfuro en mg/L vs potencial en mV es una recta

$$\text{Log (mg S}^{-}/\text{L)} = a \times (\text{mV}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a los coeficientes de la recta

12.4. Cuando la de mejor ajuste es una cuadrática, al curva de calibración es la siguiente:

$$\text{Log (mg S}^{-}/\text{L)} = a \times (\text{mV})^2 + b \times (\text{mV}) + c$$

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la recta

12.5. La concentración de sulfuro en la muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Sulfuro, mg S}^{-}/\text{L} = 10\text{EXP}[a \times (\text{mV}) + b] \times \text{Vf}/(\text{Vf}-125)$$

o

$$\text{Sulfuro, mg S}^{-}/\text{L} = 10\text{EXP}[a \times (\text{mV})^2 + b \times (\text{mV}) + c] \times \text{Vf}/(\text{Vf}-125)$$

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva

V: corresponde al potencial de la muestra en mV.

Vf: corresponde al volumen total de muestra (muestra + buffer)

125: corresponde al volumen de buffer utilizado para preservar la muestra.

12.6. En el caso de que la concentración de sulfuro en la muestra supere los 10 mg/L, es necesario realizar el análisis utilizando la técnica de Titulación Potenciométrica 4052UY.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de recuperación:** Se deben fortificar todas las muestras analizadas y verificar que el porcentaje de recuperación esté dentro de los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente. En caso contrario, si la medida es cuantificable, realizar la determinación por titulación potenciométrica (Procedimiento 4052UY).

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual sulfide ion electrode, silver ion electrode. Model 9416 Silver/Sulfide Half Cell, Model 9616 Sure-Flow TM Combination Silver/sulfide Electrodes. 1997.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2005). Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 S²⁻ A Sulfide Introduction y 4500 S²⁻ G Ion selective electrode method pp.4-170 a 4-172 y 4-177 a 4-178.

4052UY

Determinación de sulfuro en efluentes industriales,
en concentraciones superiores a 10 mg/L



Titulación potenciométrica

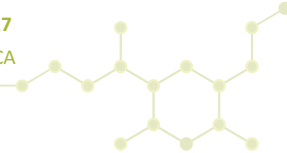
Elaborado - G. Medina

Modificado - N. Barboza

Revisado - N. Barboza

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinación de sulfuro en efluentes industriales, en concentraciones superiores a 10 mg/L (límite de cuantificación).

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RIN 09)
- 2.6. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118).
- 2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La determinación incluye todo el sulfuro presente como HS^- , H_2S y los sulfuros metálicos solubles, todos ellos son convertidos a S^{2-} con un buffer alcalino y antioxidante. El S^{2-} se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de perclorato de plomo, usando el electrodo selectivo de plata/sulfuro como indicador del punto final en la valoración.
- 3.2. El electrodo de plata/sulfuro consiste de una membrana de sulfuro de plata unida al cuerpo electródico. Cuando la membrana está en contacto con una solución conteniendo los iones plata o sulfuro, se produce una diferencia de potencial a través de la misma. Dicho potencial depende de la actividad de los iones en solución y es determinado contra un potencial de referencia. El buffer alcalino y antioxidante utilizado produce una fuerza iónica alta y constante, por lo cual la actividad del sulfuro es directamente proporcional a la concentración del ión en solución.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El buffer alcalino y antioxidante contiene una elevada concentración de hidróxido de sodio (NaOH), es muy corrosivo, por lo cual no debe tomar contacto con la piel y los ojos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los sulfuros de mercurio y plomo son insolubles en las condiciones de medida, por lo que no pueden ser determinados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en un recipiente limpio de plástico (polietileno o equivalente) de 250 mL de capacidad el cual debe contener previamente 125 mL de buffer antioxidante.
- 6.2. Evitar que quede cámara de aire en el recipiente. Proteger de la luz. Refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Analizar antes 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).
- 7.2. Electrodo selectivo de plata/sulfuro (Orion 9416).
- 7.3. Electrodo de referencia Ag^+/AgCl (Orion 9002), con sus soluciones de relleno. Cámara interna Orion 900002, cámara externa Orion 900003.
- 7.4. Alternativamente a 7.2 y 7.3, puede ser utilizado un electrodo combinado Ag/S (Orion 9616BNW) con su solución de relleno 900062

- 7.5. Agitador magnético.
- 7.6. Barras magnéticas recubiertas de teflón.
- 7.7. Vasos de Bohemia de 50 y 100 mL.
- 7.8. Balanza de resolución de 0,01 g.
- 7.9. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL).
- 7.10. Pipeta automática calibrada de 1,0 mL.
- 7.11. Balanza de resolución de 0,001 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Agua desaireada para evitar posibles oxidaciones del ión sulfuro. Para desairear, calentar agua desionizada 8.1 a ebullición durante 15 minutos, enfriar y utilizar inmediatamente.
- 8.3. Buffer antioxidante de sulfuro: pesar 80 g de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), colocarlos en Erlenmeyer de 1000 mL, agregar 800 mL de agua desionizada y desaireada (8.2), agitar hasta disolver y dejar enfriar. Agregar 35 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y 67 g de EDTA disódica ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) agitando para disolver, llevar a 1 L con agua desionizada y desaireada. Esta solución deberá ser incolora o poseer un leve color amarillo pálido, descartar cuando se torna marrón oscuro. Guardar inmediatamente en frasco hermético y sin cámara de aire para evitar oxidaciones.
- 8.4. Solución estándar de perclorato de plomo [$(Pb(ClO_4)_2)$ Nro. CAS 13453-62-8] 0,100 M: disolver 40,610 g de perclorato de plomo en agua y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Alternativamente puede utilizarse la solución comercial Orion 948206.
- 8.5. Solución stock sulfuro aproximadamente 1300 mg/L: en un Erlenmeyer de 250 mL disolver 25 g de sulfuro de sodio nohidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4) en 250 mL de agua desionizada y desaireada. Guardar en frasco de plástico con cierre hermético y sin cámara de aire.
- 8.6. Solución estándar de sulfuro de aproximadamente 130 mg/L para chequeo del electrodo: en Erlenmeyer de 125 mL colocar 10 mL de la solución stock de sulfuro, agregar 50 mL de buffer antioxidante, mezclar y llevar a 100 mL con agua desionizada y desaireada. Para el chequeo del electrodo no se requiere conocer exactamente la concentración del estándar de sulfuro.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

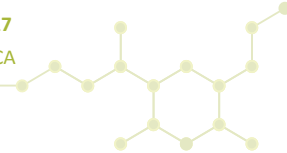
9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. La solución interna del electrodo de referencia debe estar a 2,5 cm por encima de la solución externa del mismo electrodo. La solución externa debe estar a 2,5 cm por encima de la superficie de la muestra.
- 9.2. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido por los electrodos. Dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente previo a la determinación.
- 9.3. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Si esto sucede colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

- 10.1. Realizarlo siempre que sea necesario, electrodo en desuso durante un tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.
- 10.2. Colocar en un vaso de Bohemia 20,00 mL de agua desionizada y 20,00 mL del buffer antioxidante, agregar 400 µL de la solución estándar de sulfuro, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar el (los) electrodo(s) en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.
- 10.3. Colocar a la solución anterior 4,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez estable la medida.
- 10.4. Si la temperatura de medida está entre $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de -25 a -30 mV (verificar el rango para cada electrodo en el manual del instrumento). En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al Manual de instrucciones del electrodo.



Nota 2: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí, en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 ppm de S²⁻.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Previo al análisis de la muestra registrar el volumen total, muestra + 125 mL de buffer (Vf).
- 11.2. Realizar una toma en peso de aproximadamente 40 mL de la muestra a titular, colocar en vaso de Bohemia. Sumergir el (los) electrodo(s) en la muestra y agitar suavemente.
- 11.3. Agregar con una pipeta automática de 10-100 µL la solución de perclorato de plomo en incrementos de 0,05 - 0,1 mL. Registrar el voltaje luego de cada adición. Cuando el cambio en el potencial por volumen de titulante agregado, comienza a aumentar, pasar a agregar el mismo en incrementos de 0,02 mL y continuar hasta 0,1 mL después del punto final. El punto final de la valoración está dado por un salto de potencial entre 40 y 100 mV.
- 11.4. Graficar el cambio de potencial en función del promedio del volumen antes y después de cada adición del titulante. El gasto de perclorato (G) se determina exactamente a partir de dicha curva como el volumen que provoca mayor variación de potencial.
- 11.5. Determinar la densidad de la muestra (d) pesando exactamente 1,0 mL de la misma utilizando para la toma una pipeta calibrada.

12 ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. La concentración de sulfuro en la muestra corresponde a:

$$S^{2-}, \text{ mg/L} = \frac{M \times G \times 32060 \times d \times Vf}{V \times (Vf-125)}$$

donde:

M: corresponde a la molaridad de la solución de perclorato de plomo titulante en moles/L.

G: corresponde al gasto de titulante en mL.

V: corresponde a la toma de muestra utilizada en la determinación en g.

Vf: corresponde al volumen total de muestra (muestra + buffer).

125: corresponde al volumen total de buffer usado para preservar la muestra.

d: corresponde a la densidad de la muestra en g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente. En caso contrario repetir el análisis.

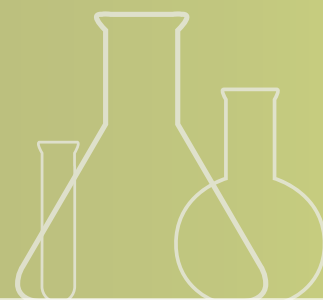
14. BIBLOGRAFÍA

- 14.1. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual sulfide ion electrode, silver ion electrode. 1980. Model 9416 Silver/Sulfide Half Cell, Model 9616 Sure-Flow TM Combination Silver/Sulfide Electrodes.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2005). Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 S²⁻ A Sulfide Introduction y 4500 S²⁻ G Ion-selective electrode method, pp. 4-170 a 4-172 y 4-177 a 4-178.



4067UY

Determinación de cianuro libre en aguas naturales y efluentes líquidos



Método potenciométrico

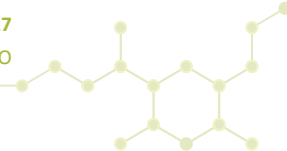
Elaborado - G. Medina

Modificado - S. Andrade

Revisado - N. Barboza

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de cianuro en aguas naturales y efluentes líquidos, en concentraciones mayores a 0,02 mg/L. El límite de detección es de 0,005 mg/L

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 98)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16)
- 2.7. Ruta de análisis código (RIN 21)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión cianuro libre es determinado electrométricamente con electrodo ión selectivo de cianuro.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El ácido cianhídrico, forma molecular en la que se presenta el ion cianuro, es un gas muy tóxico. La relación $CN^- - HCN$ depende del pH, por ello todas las soluciones de cianuro se deben mantener a pH básico. Manejar las muestras y estándares con sumo cuidado.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. En la siguiente tabla se listan los iones y la relación máxima con respecto a la concentración de cianuro en la que pueden estar presentes sin perjudicar la medida potenciométrica.

| Interferencias | Relación Máxima (moles/L) |
|--------------------|---------------------------|
| Cloruro (Cl^-) | 1 E + 6 |
| Ioduro (I^-) | 0,1 |
| Bromuro (Br^-) | 5,0 E + 3 |

- 5.2. El ión sulfuro debe estar ausente.
- 5.3. Agentes oxidantes como Cl^- , pueden llegar a destruir la mayoría de los grupos CN^- , durante el almacenamiento y su posterior manipulación.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de 1 L de capacidad. Ajustar a $pH > 12$ inmediatamente luego de extraída la muestra, con NaOH 10 M. Refrigerar a $\leq 6^\circ C$ ($> 0^\circ C$), mantener en la oscuridad.
- 6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Tiempo máximo recomendado para su análisis 14 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).
- 7.2. Electrodo ión selectivo de cianuro (Orión 9606), con su solución de relleno (Orión 900062).
- 7.3. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-10 mL).
- 7.4. Vasos de Bohemia de 50, 100 y 150 mL.

- 7.5. Agitador magnético.
- 7.6. Barras magnéticas agitadoras, recubiertas de teflón.
- 7.7. Balanza de resolución 0,001 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 M (40 g/L): disolver 20 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua.
- 8.3. Hidróxido de sodio 10 M (400 g/L): disolver 200 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua.
- 8.4. Solución control de cianuro 1000 mg/L: Disolver 1,6 g de NaOH y 2,51 g de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial Merck Nº 1.19533 o similar.
- 8.5. Solución stock de cianuro 100 mg/L: disolver 0,16 g de NaOH y 0,251 g de cianuro de sodio en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial AccuStandard WC-CN-1X-5 o similar.
- 8.6. Solución estándar de cianuro 10 mg/L: tomar 1000 µL de la solución stock de cianuro, agregar 400 µL de NaOH 1 M y llevar a 10 mL con agua destilada en tubo de plástico descartable. Registrar en la ruta de análisis, tanto la toma en gramos del estándar, como el volumen final en gramos al que es llevado.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido. Durante la determinación tanto las muestras como los estándares deben estar a la misma temperatura.
- 9.2. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.
- 9.3. Muestras con concentraciones de cianuro superiores a 25 mg/L deben ser diluidas previo a la medida para no perjudicar la vida útil del electrodo.
- 9.4. Mantener la misma posición del electrodo (profundidad de inmersión) tanto en la preparación de la curva de calibración como en la medida de las muestras.

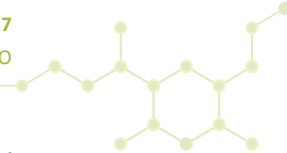
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

- 10.1. Se debe realizar siempre que sea necesario, electrodo en desuso durante tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.
- 10.2. Si el electrodo ha sido preservado seco, preparar el electrodo como se describe en el manual, sección "Electrode Preparation".
- 10.3. Conectar el electrodo al analizador de iones, enjuagar con agua destilada y secar con papel absorbente. Colocar el analizador en el modo de medida mV.
- 10.4. Colocar en un vaso de Bohemia de 150 mL, 100 ml de agua destilada. Agregar 1 mL de NaOH 10 M, mezclar suavemente con agitación magnética. Agregar 100 µL de la solución control de 1000 mg/L de cianuro y continuar con la agitación. Colocar el electrodo en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

Nota 2: No cambiar la posición del electrodo durante todo el procedimiento.

- 10.5. Agregar 1 mL de la misma solución estándar de cianuro, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez se establezca la medida.
- 10.6. Si la temperatura de medida está entre 20 y 25 °C, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe



encontrar en el rango de (-) 54-60 mV. En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al manual de instrucciones del electrodo.

Nota 3: Para el chequeo de electrodo se puede utilizar otra concentración del estándar de cianuro así como otros volúmenes de toma, pero las concentraciones finales entre ambos agregados deben diferir en un factor de 10, y estar ambas concentraciones por encima de 1 mg/L de CN⁻. Asegurarse que las relaciones de los reactivos sea la misma en todas las soluciones.

Curva de calibración:

- 10.7. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución estándar de cianuro a una solución conteniendo NaOH 10 M y agua destilada. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar los rangos entre los cuales ésta debe ser preparada.
- 10.8. Colocar un vaso de Bohemia de 150 mL sobre la balanza y tarar la misma. Agregar 100 mL de agua destilada, y 1 mL de NaOH 10 M. Registrar el peso de dicha solución (Pi). Tomar la densidad para el cálculo de volumen.
- 10.9. Sumergir el electrodo en la solución y proceder a mezclar mediante agitación magnética, dejar estabilizar aproximadamente 5 minutos previo al agregado del primer punto de la curva debido a que el electrodo deriva continuamente a bajas concentraciones de cianuro.

Nota 4: No cambiar la posición del electrodo durante todo el procedimiento, la misma posición se debe mantener durante la medida de las muestras.

- 10.10. Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de 10 o 100 mg/L de cianuro, según el fin perseguido. Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y el sensor del electrodo. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 10.11. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes de concentración exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como el potencial obtenido.
- 10.12. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Colocar un vaso de Bohemia sobre la balanza y tarar la misma. Agregar una cantidad de la muestra a medir tal que permita una correcta inmersión del electrodo. Registrar el peso (Pm).
- 11.2. Agregar un volumen de NaOH 10 M tal que su concentración final en solución sea del 1 %. Colocar una barra magnética y agitar suavemente. Sumergir el electrodo y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

Nota 5: En caso de tener que diluir la muestra, tener en cuenta el volumen tomado y volumen final para los cálculos correspondientes.

- 11.3. En caso de detectar comportamientos anormales en la muestra, será necesario realizar una fortificación de la misma y calcular el porcentaje de recuperación, registrando la toma de muestra (Pm) anterior y registrar el voltaje una vez estabilizada la lectura.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Graficar el logaritmo decimal de la concentración de cianuro en función del potencial registrado en mV.
- 12.2. La concentración de cianuro en cada punto de la curva de calibración se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Cianuro, mg/L} = \frac{V \text{ agregado} \times C \text{ estándar}}{(V \text{ agregado} + P_i/d)}$$

donde:

V: agregado corresponde a la suma de todos los volúmenes agregados del o los estándares de cianuro en mL.

C: estándar corresponde a la concentración del estándar de cianuro en mg/L que se adiciona.

Pi: corresponde al peso de la solución de agua destilada y NaOH 10 M.

d: corresponde a la densidad del agua destilada con NaOH 10 M.

12.3. Para concentraciones de cianuro mayores a 0,03 mg/L la curva de calibración del logaritmo decimal de la concentración de cianuro en función del potencial es una recta, en concentraciones menores a 0,03 mg/L la curva de mejor ajuste es cuadrática:

$$\text{Curva de calibración lineal: } \text{Log (mg CN}^-/\text{L)} = a \times \text{mV} + b$$

$$\text{Curva de calibración cuadrática: } \text{Log (mg CN}^-/\text{L)} = a \times (\text{mV})^2 + b \times (\text{mV}) + c$$

donde:

a, b y c: corresponde a los coeficientes de la curva.

12.4. La concentración de cianuro en muestras de concentraciones menores a 0,03 mg/L se calcula:

$$\text{Cianuro, mg CN}^-/\text{L} = 10\text{EXP}[a \times (\text{mV})^2 + b (\text{mV}) + c] \times (\text{Vf1 l}) / \text{Pm}$$

donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra en mV.

a, b y c: corresponde a los coeficientes de la recta.

Vf1: corresponde al volumen final (Pm mas NaOH 10 M más agua destilada)

Pm: corresponde a la toma de muestra en mL.

Nota 6: se asume densidad de la muestra de 1 g/mL. En caso contrario, incluir el valor de la densidad en el cálculo.

12.5. La concentración de cianuro en muestras de concentraciones mayores a 0,03 mg/L se calcula:

$$\text{Cianuro, mg CN}^-/\text{L} = 10\text{EXP}[a \times \text{mV} + b] \times (\text{Vf1}) / \text{Pm}$$

donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra en mV.

a y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

Vf1: corresponde al volumen final (Pm mas NaOH 10 M más agua destilada)

Pm: corresponde a la toma de muestra en mL

Nota 7: se asume densidad de la muestra de 1g/mL. En caso contrario, incluir el valor de la densidad en el cálculo.

12.6. Calcular el porcentaje de recuperación de la siguiente forma:

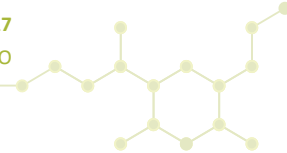
$$\% \text{ rec} = \{ [C_f \times (\text{Pm} + \text{I} + \text{Vfort}) - (\text{Cm} \times \text{Pm})] / (\text{Vfort} \times \text{Cstd}) \} \times 100$$

donde:

Cf: corresponde a la concentración final de cianuro en la muestra fortificada en mg/L.

Pm: corresponde al peso de muestra tomada para la fortificación en g.

I: corresponde a volumen de NaOH 10 M agregados a la muestra.



Vfort: corresponde al volumen del estándar usado para la fortificación en mL.

Cm: corresponde a la concentración de cianuro en la muestra original en mg/L.

Cstd: corresponde a la concentración del estándar de cianuro en mg/L usado para la fortificación.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de exactitud:** Se debe realizar el análisis de una solución control o material de referencia de la matriz correspondiente a la muestra analizada. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, según gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, evaluar la repetición del análisis (Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Control de recuperación en la medida:** Se debe realizar por lo menos una fortificación durante la determinación de las muestras con una solución de concentración conocida. Analizar tal cual las muestras y luego calcular el porcentaje de recuperación. Este porcentaje debe estar entre los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, se deben estudiar las posibles causas que pueden haber perjudicado la recuperación, en caso que la causa asignable pueda perjudicar la recuperación de las muestras se debe repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.3. **Control de precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado cada tres muestras, mínimo una serie por muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

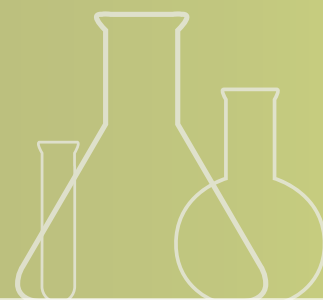
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2005). Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. Washington. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Método 4500 CN⁻ - F Cyanide-selective electrode method pp. 4-45 a 4-46.
- 14.2. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual Cyanide ion electrode, Model 9606, Combination electrode. 1997.



4068UY

Determinación de cianuro total en aguas naturales y efluentes líquidos



Método potenciométrico

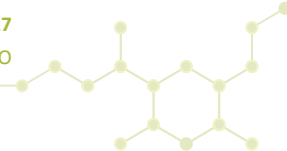
Elaborado - G. Medina

Modificado - S. Andrade

Revisado - N. Barboza

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de cianuro en aguas naturales y efluentes líquidos, en concentraciones mayores de 0,005 mg/L. Límite de detección 0,002 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 98).
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16).
- 2.7. Ruta de análisis (RIN 04 A, RIN 21).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión cianuro (CN^-) puede encontrarse en agua como ión libre o formando complejos tanto orgánicos como inorgánicos de variada estabilidad. La determinación de cianuro total implica la destilación previa de la muestra en medio ácido para disociar los complejos y eliminar posibles interferencias.
- 3.2. El ácido cianhídrico, liberado de la muestra acidificada por destilación, es arrastrado por una corriente de aire y recogido en una solución de hidróxido de sodio. El ión cianuro en el destilado alcalino es determinado electrométricamente con electrodo ion selectivo de cianuro.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Se deberá trabajar en campana de extracción durante la destilación.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.4. El ácido cianhídrico (HCN), es la forma molecular en la que se presenta el ion cianuro, siendo este un gas muy tóxico. La relación CN^- - HCN depende del pH, por ello todas las soluciones de cianuro se deben mantener a pH básico. Manejar las muestras y estándares con sumo cuidado.
- 4.5. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.
- 4.6. El proceso de destilación del ión cianuro se debe realizar en campana de extracción. Asegurarse previo al agregado de ácido al matraz de destilación, que el vacío esté operando correctamente arrastrando los gases que puedan formarse durante la destilación hacia los tubos recolectores.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Las interferencias posibles son eliminadas o reducidas al mínimo con la destilación.
- 5.2. Agentes oxidantes como cloruro (Cl^-), pueden llegar a destruir la mayoría de los grupos CN^- , durante el almacenamiento y su posterior manipulación.
- 5.3. Para muestras que contengan concentraciones mayores a 0,5 $\mu\text{g/L}$ de formaldehído, solo podrá determinarse CN^- libre ya que en condiciones de destilación puede haber pérdidas de cianuro.
- 5.4. En la siguiente tabla se listan los iones y la relación máxima con respecto a la concentración de cianuro en la que pueden estar sin perjudicar la medida.

| Interferencias | Relación Máxima (moles/L) |
|---------------------------|---------------------------|
| Cloruro (Cl^-) | 1 E + 6 |
| Ioduro (I^-) | 0,1 |
| Bromuro (Br^-) | 5,0 E + 3 |

El ión sulfuro debe estar ausente.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de 1 L de capacidad. Ajustar a pH > 12 inmediatamente luego de extraída la muestra, con NaOH 10 M. Refrigerar a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$), mantener en la oscuridad.
- 6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Tiempo máximo recomendado para su análisis 14 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de destilación: matraz de destilación, tubo de vertido, refrigerante, 2 tubos recolectores de vapores, 2 barboteadores, kitasato, trampa de agua.
- 7.2. Manta eléctrica (Electromantle o similar).
- 7.3. Analizador de iones (Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).
- 7.4. Electrodo ión selectivo de cianuro (Orión 9606), con su solución de relleno (Orión 900062).
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 μL , 100-1000 μL , 1-10 mL).
- 7.6. Probetas de 100 o 250 mL.
- 7.7. Vasos de Bohemia de 50, 100 y 150 mL.
- 7.8. Agitador magnético.
- 7.9. Barras magnéticas agitadoras, recubiertas de teflón. Balanza analítica de precisión 0,001 g.

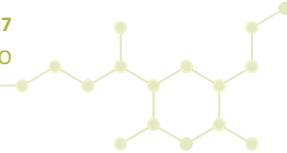
8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 M (40 g/L): disolver 20 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua.
- 8.3. Hidróxido de sodio 10 M (400 g/L): disolver 200 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 500 mL de agua.
- 8.4. Solución de cloruro de magnesio: disolver 127,5 g de cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7791-18-6) en 250 mL de agua destilada.
- 8.5. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7667-93-9), (1+1): diluir al medio ácido sulfúrico concentrado (95-97 %, $d = 1,84\text{ g/mL}$).
- 8.6. Ácido sulfámico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ Nro. CAS 5329-14-6) PA en polvo.
- 8.7. Carbonato de plomo (PbCO_3 Nro. CAS 598-63-0) o acetato de plomo (PbAc_2 Nro. CAS 6080-56-4) grado reactivo en polvo.
- 8.8. Solución control de cianuro 1000 mg/L: disolver 1,6 g de NaOH y 2,51 g de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial Merck Nro. 1.19533 o similar.
- 8.9. Solución stock de cianuro 100 mg/L: disolver 0,16 g de NaOH y 0,251 g de cianuro de sodio en 1 L de agua. Esta solución se valora semanalmente con nitrato de plata. Alternativamente utilizar una solución comercial AccuStandard WC-CN-1X-5 o similar.
- 8.10. Solución estándar de cianuro 10 mg/L: tomar 1000 μL de la solución stock de cianuro, agregar 400 μL de NaOH 1 M y llevar a 10 mL con agua destilada en tubo de plástico descartable. Registrar en la ruta de análisis, tanto la toma en gramos del estándar, como el volumen final en gramos al que es llevado.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Para evitar pérdidas del HCN que afecten la recuperación del ión cianuro se debe controlar que el vacío funcione correctamente durante todo el proceso de destilación, aproximadamente 1 burbuja por segundo, en el recipiente de destilación.
- 9.2. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido. Durante la determinación tanto las muestras como los estándares deben estar a la misma temperatura.
- 9.3. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.



- 9.4. Muestras con concentraciones de cianuro superiores a 25 mg/L deben ser diluidas previo a la medida para no perjudicar la vida útil del electrodo.
- 9.5. Mantener la misma posición del electrodo (profundidad de inmersión) tanto en la preparación de la curva de calibración como en la medida de las muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

- 10.1. Se debe realizar siempre que sea necesario, electrodo en desuso durante tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.
- 10.2. Si el electrodo ha sido preservado seco, preparar el electrodo como se describe en el manual, sección "Electrode Preparation".
- 10.3. Conectar el electrodo al analizador de iones, enjuagar con agua destilada y secar con papel absorbente. Colocar el analizador en el modo de medida mV.
- 10.4. Colocar en un vaso de bohemia de 150 mL, 100 mL de agua destilada. Agregar 1 mL de NaOH 10 M, mezclar suavemente con agitación magnética. Agregar 100 μ L de la solución control de 1000 mg/L de cianuro y continuar con la agitación. Colocar el electrodo en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

Nota 2: No cambiar la posición del electrodo durante todo el procedimiento.

- 10.5. Agregar 1,0 mL de la misma solución estándar de cianuro, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez estable la medida.
- 10.6. Si la temperatura de medida está entre 20 y 25 °C, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de (-) 54-60 mV. En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al manual de instrucciones del electrodo.

Nota 3: Para el chequeo del electrodo se puede utilizar otra concentración del estándar de cianuro así como otros volúmenes de toma, pero las concentraciones finales entre ambos agregados deben diferir en un factor de 10, y estar ambas concentraciones por encima de 1 mg/L de CN.

Asegurase que las relaciones de los reactivos sea la misma en todas las soluciones.

Curva de calibración:

- 10.7. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución estándar de cianuro a una solución conteniendo 80 % de NaOH 1 M y 20 % de agua destilada. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar los rangos entre los cuales ésta debe ser preparada.
- 10.8. Colocar un vaso de bohemia de 150 mL sobre la balanza y tarar la misma. Agregar 80 mL de NaOH 1 M y 20 mL de agua destilada, registrar el peso de dicha solución (Pi).
- 10.9. Sumergir el electrodo en la solución y proceder a mezclar mediante agitación magnética, dejar estabilizar aproximadamente 5 minutos previo al agregado del primer punto de la curva debido a que el electrodo deriva continuamente a bajas concentraciones de cianuro.

Nota 4: No cambiar la posición del electrodo durante todo el procedimiento, la misma posición se debe mantener durante la medida de las muestras.

- 10.10. Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de 10 o 100 mg/L de cianuro, según el fin perseguido. Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y el sensor del electrodo. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 10.11. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes de concentración exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como el potencial obtenido.

10.12. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Destilación de la muestra.

- 11.1.1. Homogeneizar adecuadamente la muestra. Tomar 500 mL o una alícuota de la misma, tal que el contenido de CN⁻ en la solución final donde se recoge el destilado esté en el rango de la curva de calibración (0,01 a 25 mg/L). La toma se coloca en el matraz de destilación y si es menor de 500 mL se lleva a dicho volumen con agua destilada. (P1)
- 11.1.2. Colocar en los tubos de recolección aproximadamente 40 mL de hidróxido de sodio 1 M, dicho volumen se alcanza en el cambio de diámetro del tubo. Si se sospecha generación de ácido sulfhídrico desde el matraz de destilación, agregar a cada tubo recolector 50 mg de carbonato de plomo.
- 11.1.3. Armar el equipo de destilación según diagrama (ver anexo I), suministrar agua al refrigerante y proceder a hacer vacío. Ajustar el burbujeo en el matraz de destilación tal que entre 1 burbuja de aire por segundo. Mantener dicho flujo de aire durante toda la destilación.
- 11.1.4. Agregar 2 g de ácido sulfámico en el matraz de destilación a través de del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada.
- 11.1.5. Agregar 50 mL de ácido sulfúrico (1+1) en el matraz de destilación a través de del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada. Dejar mezclar por acción del burbujeo aproximadamente 2 minutos.
- 11.1.6. Agregar 20 mL de solución de cloruro de magnesio en el matraz de destilación a través del tubo de entrada de aire. Enjuagar con agua destilada. Dejar mezclar por acción del burbujeo aproximadamente 2 minutos.
- 11.1.7. Encender la manta calefactora. Esperar que se alcance la ebullición, mantener allí 1 hora controlando en todo momento el flujo de aire que atraviesa el sistema. Este punto es crítico para que no se produzcan pérdidas por el sistema, si la ebullición es demasiado violenta se puede aumentar el vacío a 2 burbujas de aire por segundo, para evitar que se reabsorba la muestra por el tubo de entrada de aire.
- 11.1.8. Finalizada la destilación apagar la manta calefactora y dejar el sistema con arrastre de aire hasta alcanzar temperatura ambiente.
- 11.1.9. Retirar los tubos de recolección de cianuro, y transvasar cuantitativamente ambos contenidos a un matraz de 100 mL, enjuagar al menos una vez con agua y recogerla en el matraz junto con la muestra. Registrar el volumen final obtenido. El destilado está listo para proseguir con la determinación.

Nota 5: Las tomas de volumen de muestra, pueden realizarse al peso, si se asume densidad de 1 g/mL. En caso de no cumplimiento, se deberá tener en cuenta para el cálculo correspondiente.

- 11.2. Colocar en un vaso de Bohemia una cantidad de la muestra a medir tal que permita una correcta inmersión del electrodo. Anotar en la ruta de análisis la toma realizada (P2). Puede requerirse de una dilución previa, debiendo dejar registrado la toma de muestra (P2) y el volumen final (V_{f2}). Agregar una barra magnética y agitar suavemente. Sumergir el electrodo y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.
- 11.3. En caso de hacer una fortificación, registrar el volumen agregado a la toma de muestra (Pm) anterior y registrar el voltaje una vez estabilizada la lectura.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Graficar el logaritmo decimal de la concentración de cianuro en función del potencial registrado en mV.
- 12.2. La concentración de cianuro en cada punto de la curva de calibración se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Cianuro, mg/L} = \frac{V \text{ agregado} \times C \text{ estándar}}{(V \text{ agregado} + P_i/d)}$$

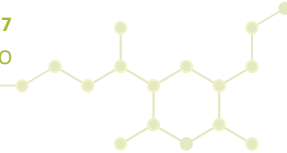
donde:

V: agregado corresponde a la suma de todos los volúmenes agregados del o los estándares de cianuro en mL.

C: estándar corresponde a la concentración del estándar de cianuro en mg/L que se adiciona.

P_i: corresponde al peso de la solución de agua destilada y NaOH 1 M.

d: corresponde a la densidad en g/mL de la solución de agua destilada y NaOH 1 M.



12.3. Para concentraciones de cianuro mayores a 0,03 mg/L la curva de calibración del logaritmo decimal de la concentración de cianuro en función del potencial es una recta, en concentraciones menores a 0,03 mg/L la curva de mejor ajuste es cuadrática:

$$\text{Curva de calibración lineal: } \text{Log (mg CN}^-/\text{L)} = a \times \text{mV} + b$$

$$\text{Curva de calibración cuadrática: } \text{Log (mg CN}^-/\text{L)} = a \times (\text{mV})^2 + b \times (\text{mV}) + c$$

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva correspondiente.

12.4. La concentración de cianuro en muestras de concentraciones menores a 0,03 mg/L se calcula:

$$\text{Cianuro, mg CN}^-/\text{L} = 10\text{EXP}[a \times (\text{mV})^2 + b (\text{mV})+c] \times \text{FD1} \times \text{FD2}$$

donde:

mV: corresponde a potencial de la muestra en mV.

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva.

$$\text{FD 1} = \text{Vf}_1 / \text{P1}$$

donde:

Vf₁: corresponde al volumen en mL del matraz donde se recogió el destilado.

P1: corresponde a la toma de muestra en mL utilizada para la destilación.

$$\text{FD 2} = \text{Vf}_2 / \text{P2}$$

donde:

Vf₂: corresponde al volumen en mL de la dilución de la muestra para lectura con el electrodo

P2: corresponde a la toma de muestra para la lectura con el electrodo

Nota 5: se asume densidad de la muestra 1 g/ml, en caso contrario, considerar el valor real en el cálculo.

12.5. La concentración de cianuro en muestras de concentraciones mayores a 0,03 mg/L se calcula:

$$\text{Cianuro, mg CN}^-/\text{L} = 10\text{EXP}(a \times \text{mV} + b) \times \text{FD1} \times \text{FD2}$$

donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra en mV.

a y b: corresponde a los coeficientes de la curva.

$$\text{FD 1} = \text{Vf}_1 / \text{P1}$$

donde:

Vf₁: corresponde al volumen en mL del matraz donde se recogió el destilado.

P1: corresponde a la toma de muestra en mL utilizada para la destilación.

$$\text{FD 2} = \text{Vf}_2 / \text{P2}$$

donde:

Vf₂: corresponde al volumen en mL de la dilución de la muestra para lectura con el electrodo.

P2: corresponde a la toma de muestra para la lectura con el electrodo.

Nota 6: se asume densidad de la muestra 1 g/mL, en caso contrario, considerar el valor real en el cálculo.

12.6. Calcular el porcentaje de recuperación de la siguiente forma:

$$\%rec = \{[Cf \times (Pm + Vfort) - (Cm \times Pm)] / (Vfort \times Cstd)\} \times 100$$

donde:

Cf: corresponde a la concentración final de cianuro en la muestra fortificada en mg/L.

Pm: corresponde al peso de muestra tomada para la fortificación en g.

Vfort: corresponde al volumen del estándar usado para la fortificación en mL.

Cm: corresponde a la concentración de cianuro en la muestra original en mg/L.

Cstd: corresponde a la concentración del estándar de cianuro en mg/L usado para la fortificación.

Nota 7: se asume densidad de la muestra 1 g/mL, en caso contrario, considerar el valor real en el cálculo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de recuperación en la destilación:** Se debe realizar la destilación y determinación de una solución control o material de referencia de la matriz correspondiente a la muestra analizada. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, según gráfico de control correspondiente.

Para muestras que presenten comportamiento anormal, se deberá fortificar la muestra y realizar el destilado. Calcular el % de recuperación según control de calidad analítico.

Cuando no se encuentren dentro de los límites de tolerancia, se deben estudiar las posibles causas que pueden haber perjudicado la recuperación del control, en caso que la causa asignable pueda perjudicar la recuperación de las muestras se debe repetir el análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

13.2. **Control de exactitud:** Se debe realizar la determinación de una solución control o material de referencia. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación, según gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, se deberá evaluar la repetición del análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

13.3. **Control de recuperación en la medida:** Se debe realizar por lo menos una fortificación durante la determinación de las muestras con una solución de concentración conocida. El porcentaje de recuperación debe estar entre los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites de tolerancia, se deben estudiar las posibles causas que pueden haber perjudicado la recuperación del control, en caso que la causa asignable pueda perjudicar la recuperación de las muestras se debe repetir el análisis (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

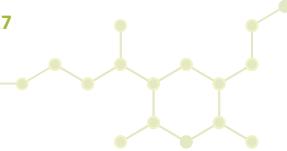
13.4. **Control de precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado cada tres muestras, mínimo una serie por muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente (ver Manual de Control de Calidad Analítico).

13.5. **Blanco de destilado:** se deberá analizar un blanco que incluya toda las etapas analíticas (destilación y desarrollo de color). Se realiza 1 cada 10 muestras, mínimo 1 por corrida. En caso de contar con grafico de blancos, registrar los valores obtenidos, según fecha de análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

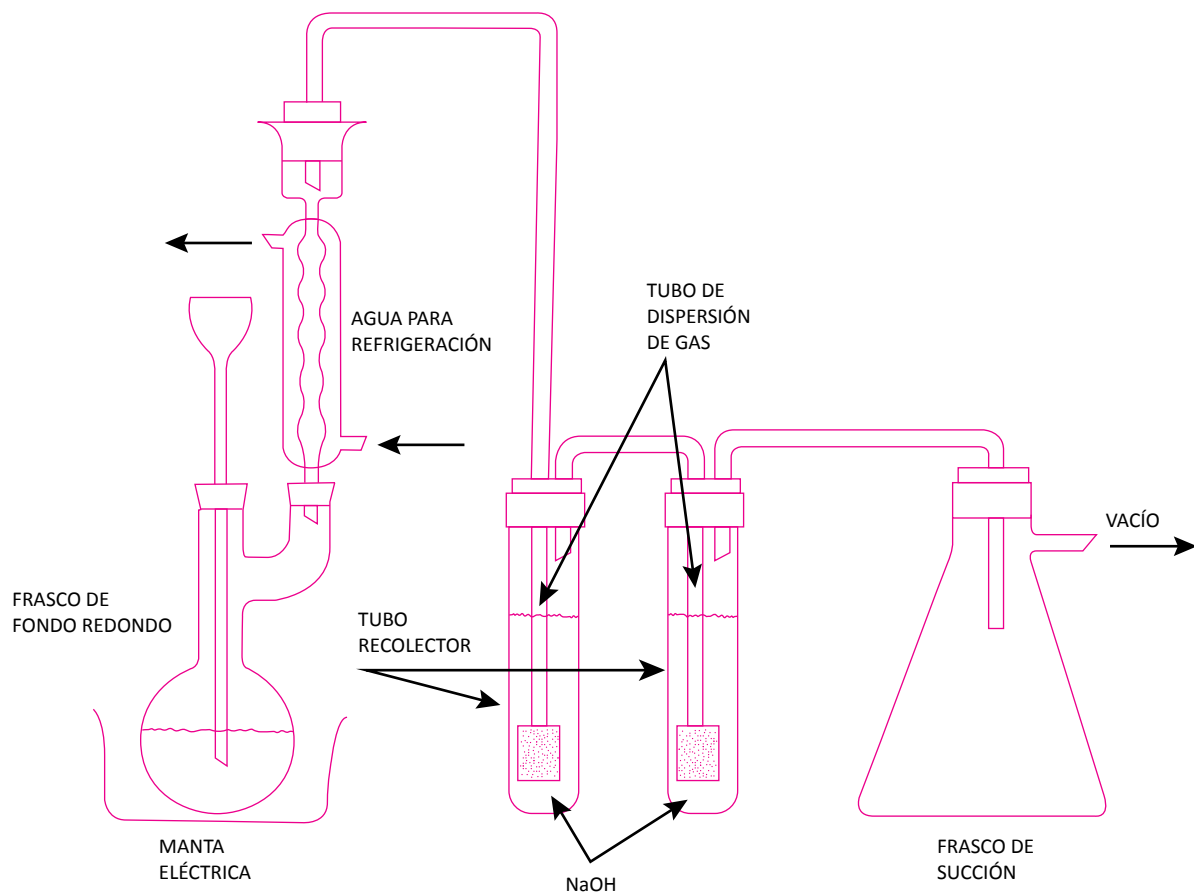
14.1. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard Methods for the Examination de Water and Wastewater. 21th edition. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Métodos 4500 - CN⁻ C Total cyanide after distillation y 4500 CN⁻ F Cyanide-selective electrode method pp. 4-39 a 4-40 y pp.4-43 a 4-44.

14.2. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual Cyanide Ion Electrode, Model 9606, Combination electrode. 1997.



ANEXO I

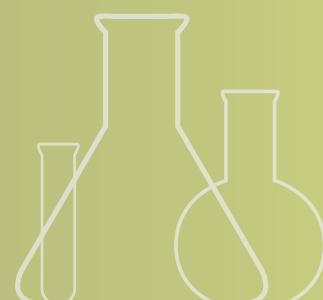
Diagrama del Equipo de Destilación





4077UY

Determinación de fluoruro en aguas naturales y efluentes industriales líquidos



Método potenciométrico

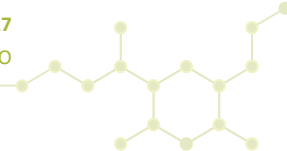
Elaborado - N. Barboza

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinación de fluoruro en aguas naturales y efluentes industriales líquidos. El límite de detección de la metodología es de 0,04 mg F/L y se puede determinar fluoruro cuantitativamente a partir de 0,1 mg F/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118, INE 98)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16B)
- 2.7. Ruta de análisis código (RIN 23)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El electrodo selectivo de fluoruro está compuesto por un modulo sensor contenido dentro de un cuerpo epoxi. Cuando el elemento sensor se encuentra en contacto con una solución conteniendo iones fluoruro, se genera un potencial que depende de la actividad de dicho fluoruro en solución. Dicho potencial es medido contra un potencial de referencia interno con un pH/mV meter.
- 3.2. El electrodo mide la actividad del ion fluoruro que se define como:

$$A = \gamma C$$

donde:

A: corresponde a la actividad del ión fluoruro

γ : corresponde al coeficiente de actividad

C: corresponde a la concentración de los iones fluoruro libres en solución.

La actividad del ion fluoruro depende de la fuerza iónica total, del pH y de las especies generadoras de complejos presentes. Agregando un buffer apropiado se provee una fuerza iónica alta y constante y así la actividad es directamente proporcional a la concentración del ión fluoruro.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

| Sustancia | Conc. mg/L | Tipo de error |
|---|------------|---------------|
| Alcalinidad (CaCO ₃) | 7000 | + |
| Aluminio (Al ³⁺) | 3,0 | - |
| Cloruro (Cl ⁻) | 20000 | |
| Cloro | 5000 | |
| Hierro | 200 | - |
| Hexametáfosfato (NaPO ₃) ₆ | 50000 | |
| Fosfato (PO ₄ ³⁻) | 50000 | |
| Sulfato (SO ₄ ²⁻) | 50000 | - |

5. INTERFERENCIAS

+ indica error positivo

- indica error negativo

en blanco indica error no medido

Es importante asegurar que el pH de la solución de la muestra con el buffer, presenta un pH entre 5 y 6. De lo contrario ajustar el pH de la muestra previo al agregado de la solución reguladora de fuerza iónica. Esto se debe a que en soluciones con $\text{pH} < 5$, se forman complejos HF y/o HF_2^- , los cuales no pueden ser detectados por el electrodo y en soluciones básicas con baja cantidad de fluoruro, el ion OH^- es medido como F^- .

Nota 1: No pueden utilizarse ni bases ni ácidos fuertes para ajustar el pH. Puede utilizarse ácido acético para acidificar y acetato de sodio 4 M para basificar.

Nota 2: En muestras con contenido de cloruro $> 2000 \text{ mg/L}$ se requerirá de una destilación previa.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio, plástico (polietileno o equivalente) o bolsa de polietileno para muestras líquidas descartable. Refrigerar a $\leq 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($> 0 \text{ }^\circ\text{C}$) y analizar tan pronto como sea posible. Máximo 28 días. Para este análisis son necesarios 200 mL de muestra. En muestras con contenido de cloruro $> 2000 \text{ mg/L}$ se requiere destilación previa.

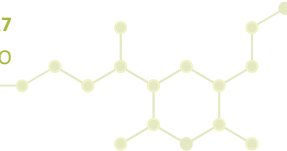
7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).
- 7.2. Electrodo combinado selectivo de fluoruro (Orion 96-09) con solución interna de relleno Orion 900061.
- 7.3. Agitador magnético.
- 7.4. Barras magnéticas recubiertas de teflón.
- 7.5. Vaso de Bohemia de 125 mL, de 250 mL o matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- 7.6. Pipetas automáticas de volúmenes variables (10 - 100 μL y de 100-1000 μL).
- 7.7. Balanza de resolución 0,01 g (INE 06, INE 16B).

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución stock de fluoruro: pesar 221,0 mg de fluoruro de sodio anhidro, (NaF Nro. CAS 7681-049-4) secado en estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Disolver en 1000 mL de agua 8.1; 1,00 mL corresponde a 100 $\mu\text{g F}^-$ (100 mg/L). Esta solución es estable por 6 meses. Alternativamente utilizar una solución comercial de 100 mg de F/L (Orion 940907 o similar).
- 8.3. Solución estándar de fluoruro: diluir 100 mL de solución stock de fluoruro, hasta 1000 mL con agua destilada, 1,00 mL corresponde a 10 $\mu\text{g F}^-$ (10 mg/L).
- 8.4. Solución reguladora de fuerza iónica (solución de interferencias): se colocan aproximadamente 500 mL de agua 8.1 en un matraz de 1 L. Agregar 57 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ Nro. CAS 64-19-7), 58 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5) PA y 4,0 g de ácido 1,2 ciclohexilenediaminotetracético (CDTA $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8$ Nro. CAS 482-54-2). Agitar para disolver. Colocar un electrodo de pH calibrado en la solución, lentamente se agrega hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS1310-73-2), 5 N (aproximadamente 120 mL) hasta ajustar el pH entre 5,3 y 5,5. Enfriar hasta temperatura ambiente. Llevar el volumen del matraz a 1 L con agua 8.1.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El tiempo requerido para alcanzar el 99 % de la estabilidad de la lectura puede variar desde algunos segundos en soluciones concentradas, hasta varios minutos si la concentración esta cerca del límite de detección.
- 9.2. El electrodo de fluoruro debe sumergirse unos 2 cm en la solución y realizar todas las determinaciones de la misma manera, para así evitar medidas erráticas.
- 9.3. Trabajar a la misma temperatura durante la calibración y la medida de las muestras. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución a medir. Si esto sucede, colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

- 10.1. Agregar solución de relleno cada vez, antes de usar el electrodo.
- 10.2. El chequeo del electrodo debe realizarse siempre que sea necesario: electrodo en desuso por tiempo prolongado, medidas erráticas. Consultar el manual del electrodo.
- 10.3. Conectar el electrodo de fluoruro al analizador de iones, enjuagar con agua destilada y secar con papel absorbente.
- 10.4. Colocar en un vaso de 100 mL de Bohemia 20,00 mL de agua destilada libre de fluoruro y 20,00 mL de solución reguladora de fuerza iónica. Agregar 1 mL de la solución estándar de 100 mg/L, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar el electrodo en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida, la estabilización puede requerir hasta 5 minutos.
- 10.5. Agregar a la solución anterior 10,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que la medida se haya estabilizado.
- 10.6. Si la temperatura de medida está entre $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la diferencia de voltaje (slope) entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de - 54 a - 60 mV. En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al "Manual de instrucciones del electrodo".

Nota 3: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 mg/L.

Curva de calibración:

- 10.7 La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución stock o de la solución estándar de fluoruro, a una solución 1:1 de agua destilada y solución reguladora de fuerza iónica. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar el rango de la misma.
- 10.8 Colocar 40 mL de agua y 40 mL de la solución reguladora de fuerza iónica en un vaso de Bohemia de 120 mL, registrar el peso de dicha solución, (Pi). Se pueden agregar otros volúmenes, manteniendo la relación 1:1 agua-solución de interferencias.
- 10.9 Sumergir el electrodo en la solución y mezclar suavemente mediante agitación magnética.
- 10.10 Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de 100 o 10 mg/L de fluoruro, según el fin perseguido. Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y el sensor del electrodo. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.
- 10.11 Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como los potenciales obtenidos.
- 10.12 Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.
- 10.13 Es recomendable verificar la calibración cada 2 horas colocando el electrodo en una alícuota nueva del estándar utilizado para la calibración. Si la medida cambia, recalibrar.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Colocar 30 mL de la muestra (Pm) o una dilución apropiada de la misma y 30 mL de la solución reguladora de fuerza iónica (Pf) en un vaso de Bohemia o Erlenmeyer. Sumergir el electrodo, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida. La toma de la muestra y de la solución reguladora de fuerza iónica debe realizarse en peso con una precisión de al menos 0,01 g. Se pueden agregar otros volúmenes, manteniendo la relación 1:1 agua - solución reguladora de fuerza iónica.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1 La concentración de fluoruro para cada punto de la curva de calibración se calcula:

$$\text{Fluoruro, mg /L} = \frac{V_{\text{agregado}} \times C_{\text{estándar}}}{(V_{\text{agregado}} + V_{\text{inicial}})}$$

donde:

V_{agregado} : corresponde a la suma de los volúmenes agregados de estándar

V_{inicial} : corresponde a V_i (se considera la densidad de solución acuosa 1,0 g/mL)

$C_{\text{estándar}}$: corresponde a la concentración del estándar que se adiciona en mg F /L.

12.2 Graficar el logaritmo decimal de la concentración de fluoruro, en función al opuesto del potencial registrado en mV (-mV).

12.3 Para concentraciones de fluoruro menores a 1 mg/L la curva de calibración que mejor se ajusta es una cuadrática. A concentraciones mayores la curva de calibración que mejor se ajusta, es una recta.

$$\text{curva de calibración cuadrática: } \log (\text{mg F/L}) = a \times (-\text{mV})^2 + b \times (-\text{mV}) + c$$

$$\text{curva de calibración lineal: } \log (\text{mg F/L}) = a \times (-\text{mV}) + b$$

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de ajuste de las curvas.

12.4 La concentración de fluoruro se calcula según la ecuación correspondiente:

$$\text{Rango cuadrático: Fluoruro, mg F/L} = 10\text{EXP} [a \times (-\text{mV})^2 + b \times (-\text{mV}) + c] \times \text{Pf/Pm}$$

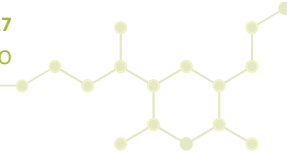
$$\text{Rango Lineal Fluoruro, mg F/L} = 10\text{EXP} [(a \times (-\text{mV}) + b) \times \text{Pf /Pm}]$$

donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra.

Pf. corresponde al peso final de muestra + solución de interferencias (+ agua, en caso de dilución) en g. Se asume densidad de la muestra 1 g/mL.

Pm: corresponde al peso de muestra en g. Se asume densidad de la muestra 1 g/mL.



a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva de calibración en cada caso.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de exactitud:** Analizar la solución de “Control de Fluoruro” (elaborada por el sector Control de Calidad) simultáneamente con las muestras. Se puede utilizar como control otra solución de concentración conocida, preparada independientemente de la utilizada en la curva de calibración. Se compara el resultado con el gráfico de control correspondiente; en su defecto utilizar el criterio de aceptación de 90 a 110 %. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.
- 13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por batch de muestras. Se aceptara una dispersión máxima de 10 % (RSD), de lo contrario deberá repetirse el análisis.

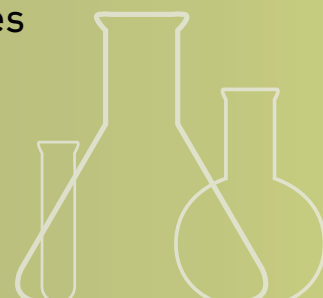
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21th edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 – F- C Ion selective electrode method pp. 4-84 a 4-85.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21th edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 – F- B Preliminary Distillation Step pp. 4-83 a 4-84.
- 14.3. Manual del electrodo. Fluoride Combination electrode. Instruction Manual. Orion, Model 94-09 y 96-09.



4080UY

Determinación de Amonio en aguas naturales (superficiales o subterráneas) y efluentes industriales líquidos



Método espectrofotométrico

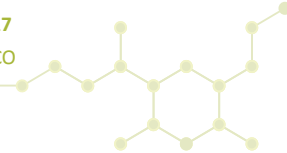
Elaborado - N. Barboza

Modificado - R. Galvez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de amonio en aguas naturales (superficiales o subterráneas) y en efluentes industriales. No es aplicable a muestras salinas.

Rango de trabajo entre el límite de cuantificación y un valor máximo de 250 mg NH_4^+ N/L (obtenido por dilución máxima validada).

El límite de detección calculado es de 0,0044 mg NH_4^+ N/L, y el límite de cuantificación de 0,013 mg NH_4^+ N/L. Este método es alternativo a la determinación por potenciometría.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.1. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Ruta de análisis código (RIN 25)
- 2.3. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 38)
- 2.4. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se considera amonio disuelto tanto al amoníaco libre ($\text{NH}_3(\text{aq})$) como a los iones amonio (NH_4^+) presentes en solución.
- 3.2. En aguas naturales y residuales las formas de nitrógeno de mayor interés son, en orden decreciente de estado de oxidación, nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno orgánico. Todas estas formas son interconvertibles siendo componentes del ciclo del nitrógeno.
- 3.3. La formación de un compuesto de color azul intenso, indofenol, está dada por la reacción entre el amonio, hipoclorito y fenol en presencia de nitroprusiato de sodio como catalizador. El desarrollo de color se mide espectrofotométricamente a 640 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. Tener especial cuidado con la solución de fenol, ya que esta emite vapores tóxicos.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La interferencia producida por turbidez se elimina por filtración; con filtro de acetato de celulosa y tamaño de poro 0,45 μm .
- 5.2. Se elimina la posible interferencia de iones magnesio y calcio por formación de un complejo con citrato, produciéndose la precipitación del mismo a altos valores de pH.
- 5.3. Si hay presencia de sulfuro de hidrógeno, removerlo acidificando la muestra a un pH 3 con HCl diluido, y aireando la misma hasta que el olor a sulfuro no sea detectado.
- 5.4. Las aminas volátiles dan interferencia positiva.
- 5.5. Las posibles interferencias de muestras coloreadas, que puedan absorber en la misma longitud de onda de determinación, se eliminan midiendo la absorbancia inicial, previo al desarrollo de color.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente); se requieren como mínimo 250 mL para la realización del análisis. Refrigerar a temperatura $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Las muestras deben ser filtradas por filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.
- 6.2. Sin preservación se recomienda el análisis dentro de las 24 h de realizado el muestreo.
De no ser posible, ajustar a $\text{pH} < 2$ con ácido sulfúrico concentrado y analizar dentro de los 7 días siguientes; la muestra debe ser llevada a $\text{pH} 7$ previa a su análisis, con NaOH o KOH.

Para preservar la muestra por 28 días y congelar (sin acidificar) a -20 °C.

6.3. Es de destacar que la preservación acidificando no es conveniente para todo tipo de muestras.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Tubos con tapa rosca de al menos 25 mL de capacidad.
- 7.2. Pipetas automáticas de volumen variable calibradas (10-100 µL; 100 a 1000 µL y 1-10mL).
- 7.3. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.4. Balanza de resolución 0,001 g
- 7.5. Espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys. Se trabaja a una longitud de onda de 640 nm con una celda de camino óptico de 2,5 cm.
- 7.6. Equipo de filtración para interferencias por turbidez.

Nota 1: Puede ser utilizado cualquier espectrofotómetro que se ajuste a los requerimientos específicos.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución de fenol: mezclar 11,1 mL de fenol líquido (C₆H₅OH Nro. CAS 108-95-2 pureza mayor o igual a 89 %) con etanol (CH₃CH₂OH Nro. CAS 64-17-5) 95 % v/v hasta un volumen final de 100 mL. Preparar semanalmente.
- 8.3. **Nitroprusiato de sodio, 0,5 % p/v:** Disolver 0,5 g de nitroprusiato de sodio (dihidrato nitroferriicianuro sódico Na₂Fe(CN)₅NO·2H₂O Nro. CAS 13755-38-9) en 100 mL de agua desionizada. Almacenar en botella color ámbar. Preparar mensualmente.
- 8.4. **Citrato alcalino:** disolver 20 g de citrato trisódico (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O Nro. CAS 6132-04-3) con 1 g de NaOH (Nro. CAS 1310-73-2) en agua desionizada. Diluir a 100 mL.
- 8.5. **Hipoclorito de sodio** (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9): utilizar solución comercial al 5 %, tener en cuenta que esta solución se descompone lentamente, reponer cada dos meses.
- 8.6. **Solución oxidante:** Mezclar 100 mL de la solución de citrato alcalino con 25 mL de la solución de hipoclorito. Preparar diariamente.
- 8.7. **Solución stock de amonio:** Disolver 3,819 g de NH₄Cl anhidro (Nro. CAS 12125-02-9, secado a 100 °C) en agua desionizada y llevar a 1000 mL (1000 mg NH₄⁺ N/L). 1 mL = 1,00 mg N = 1,22 mg NH₃. Almacenar en recipiente de plástico a ≤ 6 °C (> 0°C), hasta 6 meses.
- 8.8. **Solución estándar de amonio:** Tomar 1 mL de la solución stock de amonio y llevar a un volumen final de 100 mL, 10 mg NH₄⁺ N/L. 1mL = 10 µg N. Preparar diariamente. (Se puede utilizar material de referencia certificado)
- 8.9. **Solución control:** ver Manual de Control de Calidad Analítico.

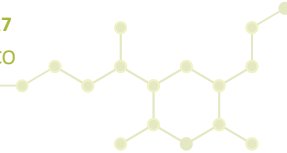
Nota 2: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. En caso de haber acidificado la muestra, neutralizarla con NaOH o KOH previo a la determinación del analito.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. La curva de calibración se prepara a partir de la solución estándar de amonio, tomando volúmenes variables según el rango de medida y llevar a un volumen final de 25 mL con agua 8.1. Los estándares de la curva de calibración deben cubrir el rango lineal del método (hasta 0,6 mg NH₃⁻ N/L)
- 10.2. Medir la absorbancia de cada tubo a 640 nm. (Abs inicial)
- 10.3. Agregar 1 mL de la solución de fenol, 1ml de la solución de nitroprusiato de sodio y 2,5 mL de la solución oxidante, agitando después de cada agregado.
- 10.4. Tapar los tubos y dejar a temperatura ambiente (22 a 27 °C) en un lugar con luz tenue por al menos 1 hora. Tener en cuenta que el color es estable por 24 horas.



10.5. Medir la absorbancia obtenida luego del desarrollo de color a 640 nm. (Abs final)

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Realizar una toma de 25 mL de muestra o una dilución apropiada de la misma y llevar a 25 mL con agua 8.1
- 11.2. Continuar según los pasos 10.2, 10.3, 10.4 y 10.5.

Nota 3: se realizan todas las tomas en peso, considerando densidad 1 mg/mL

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Graficar datos de absorbancia en función de la concentración de los estándares y obtener la ecuación de la curva.

$$\text{Curva de calibración lineal: Abs} = a \times (\text{mg NH}_4^+ \text{ N /L}) + b$$

12.2. La concentración de amonio se calcula según:

$$\text{Amonio, mg N /L} = \frac{(\text{Abs} - b) \times \text{FD1} \times \text{FD2}}{A}$$

donde:

Abs: corresponde a la absorbancia de la muestra = (Abs final- Abs inicial)

a: corresponde a pendiente de la curva obtenida con los estándares

b: corresponde a la ordenada en el origen de la curva obtenida con los estándares

FD1 = toma de muestra / volumen final; (dilución previa)

FD2 = toma de la dilución previa / volumen final en el tubo

Nota 4: Para muestras muy concentradas puede ser necesario realizar una dilución previa (FD1), esta dilución tiene un máximo de 100 veces, este máximo fue obtenido en la validación del método.

Para el FD2, se toman 5 mL aproximadamente en peso de la dilución previa, y se llevan a volumen final de 25 mL (en peso, asumiendo densidad 1, obteniendo de esta manera una dilución máxima de 500 veces).

12.3. El % de recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\% \text{ Fortificación, mg N/L} = \frac{(\text{Vol final} \times \text{Conc final}) - ((\text{vol final} - \text{toma de muestra}) \times \text{Conc.mtra})}{(\text{Toma std} \times \text{Conc.std})}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** analizar la solución de “Control de Amonio” (elaborada por el sector Control de Calidad) simultáneamente con las muestras, realizar una toma de la solución control de forma tal que se ajuste a la curva de calibración a elaborar y proceder según análisis de muestra (11). Se aceptará un valor de concentración que esté entre los límites establecidos en el gráfico de control de exactitud del método. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Control de la precisión:** Se realizaran por duplicado una muestra de cada cinco, y como mínimo uno por serie de muestras. Verificar que el rango normalizado de los duplicados sea menor al límite establecido en el gráfico de control de precisión.
- 13.3. **Fortificación:** Se realizaran fortificaciones (con la solución control) en todas las muestras de efluentes industriales o que se sospecha interferencia de la matriz. Verificar que el porcentaje de recuperación de la fortificación se encuentre bajo control estadístico. Si algún resultado se encuentra fuera de control revisar el procedimiento; y si corresponde repetir el análisis.
- 13.4. Si se cuenta con material de referencia certificado para esta técnica, se puede realizar la curva de calibración con dicho material.

14. BIBLIOGRAFÍA

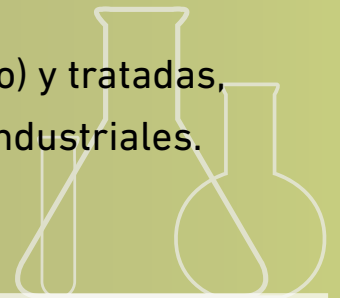
- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 NH3 F Phenate method 4-115 a 4-116.

4085UY

Determinación de Nitrato en aguas naturales (incluyendo aquellas con alto contenido salino) y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

Reducción por cadmio.

Método FIA



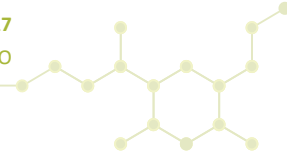
Elaborado - E. Rodó

Modificado - N. Barboza

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrato (NO_3^-) en aguas naturales (incluyendo aquellas con alto contenido salino) y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrato en un rango de 0,06 - 20 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra. El límite inferior puede verse afectado por interferencias de la matriz. El límite de detección 0,020 mg NO_3^- N/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 15)
- 2.6. Instructivo de uso balanza de resolución 0,001 g (INE 16)
- 2.7. Instructivo de uso del FIAS (INE 78)
- 2.8. Ruta de análisis de nitrato y nitrito (RIN 33)
- 2.9. Instructivo para preparación de agua desionizada (DI)(INE 28)
- 2.10. Instructivo para el uso del destilador (INE 36)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El nitrato es reducido a nitrito (NO_2^-) al pasar la muestra a través de una columna de cadmio copperizado. El nitrito (nitrato reducido más nitrito original) es determinado mediante la formación de un compuesto azo de color rojo por la reacción con sulfanilamidiazotada y N- (1-naftil)- etilendiaminadihidrocloro (NED dihidrocloro). El compuesto formado, altamente coloreado, es medido espectrofotométricamente a 520 nm de longitud de onda.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. El cloro residual puede interferir oxidando el poder reductor de la columna.
- 5.2. Pueden obtenerse bajos resultados con muestras que presenten altas concentraciones de hierro, cobre u otros metales. En el presente método, EDTA es añadido al buffer de forma de reducir este tipo de interferencia.
- 5.3. Altas concentraciones de grasas y aceites podrían cubrir la superficie de cadmio, esta interferencia puede eliminarse realizando una pre-extracción de la muestra utilizando un solvente orgánico.
- 5.4. La turbidez puede interferir, pero esta puede ser removida filtrando la muestra a través de un filtro de membrana de 0,45 μm previo del análisis.
- 5.5. Muestras con alto contenido de cloruro de mercurio pueden interferir en el correcto desempeño de la columna de cadmio.
- 5.6. La muestra deberá presentar un pH entre 7 y 9, en caso contrario, deberá ajustarse con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) según corresponda.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Se requiere al menos 250 mL de muestra para realizar el análisis.
- 6.2. Para contar con el dato de nitrato independiente al de nitrito, es necesario realizar el análisis antes de las 48 horas de recolectada la muestra.

- 6.3. Para Nitrato+Nitrito (combinado): si la muestra no va a ser analizada dentro de las 48 horas de recolectada, acidificarla hasta pH < 2 con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro de muestra, refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C) y analizarla dentro de un periodo de 28 días. En este caso no se podrá determinar nitrato y nitrito como especies individuales.
- 6.4. Las muestras deben ser pre-filtradas por 0,45 μm si la concentración de los sólidos suspendidos pudiera afectar el flujo en la columna de cadmio. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin filtración previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

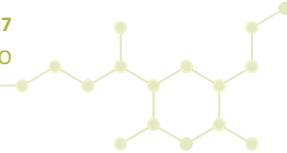
- 7.1. Equipo de inyección de flujo diseñado para tomar y reaccionar con la muestra y reactivos en el orden y en las proporciones requeridas (INE 78):
- Autosampler (IN328)
 - Bomba multicanal (IN329)
 - Unidad de reacción o manifold (IN330)
 - Detector colorimétrico (IN317)
 - Sistema de Datos OMNIOM 3.0
 - Celda de flujo de vidrio de 10 mm y 80 μL
- 7.2. Balanza de resolución 0,01 g (AND HF-2000G o similar)
- 7.3. Balanza de resolución de 0,001 g (Precisa 205A o similar)
- 7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL
- 7.5. Matraces aforado de 1000 mL
- 7.6. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 500 mL

8. REACTIVOS

- 8.1. Hidróxido de sodio 15 N: Disolver lentamente 150 g de NaOH (Nro. CAS 1310-73-2) en 250 mL de agua desionizada en recipiente de vidrio. Agitar con agitador magnético hasta disolver completamente. Se debe tener precaución ya que esta solución libera calor por ser exotérmica. Una vez alcanzada la temperatura ambiente almacenar en botella de plástico.
- 8.2. Buffer de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS. 12125-02-9), opción 1: en un recipiente de 1 L de capacidad, agregar 85 g de cloruro de amonio, 1,0 g de EDTA disódicodihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 6381-92-6) y 938 g de agua desionizada (DI). Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8,5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N.
- 8.3. Buffer de cloruro de amonio, opción 2: en un recipiente de 1 L agregar 800 g agua desionizada, 126 g de ácido clorhídrico concentrado (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 85 g de cloruro de amonio y 1,0 g de EDTA disódicodihidratado. Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8,5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N o HCl.

Nota 1: El cloruro de amonio utilizado en el buffer 8.2 puede llegar a presentar contaminación con nitrato; si se observan cambios en los blancos de reactivos se sugiere utilizar el buffer 8.3.

- 8.4. Reactivo colorante: añadir a un recipiente de capacidad 1 L color ámbar 876 g de agua desionizada, 170 g de ácido ortofosfórico 85 % (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2), 40,0 g de sulfanilamida y 1,0 g de N-(1 naftil)-etilendiaminadihidrocloro (NED). Agitar utilizando agitador magnético durante 30 minutos hasta disolver. Esta solución es estable durante un mes.
- 8.5. Solución stock de nitrato (200 mg N/L): pesar 1,444 g de nitrato de potasio (KNO_3 Nro. CAS 7757-79-1) seco, disolver con agua desionizada en matraz aforado de 1000 mL, agitar hasta disolución y luego enrasar. Esta solución es estable por 6 meses.
- 8.6. Solución control: solución independiente de la 8.5. Es posible utilizar solución comercial de concentración conocida, ORION 920706 o similar.
- 8.7. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).



Nota 2: Todos los reactivos deben ser almacenados en recipientes de vidrio, provistos de etiquetas con el nombre del reactivo, fecha de preparación e iniciales del analista responsable de la preparación.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Para el cuidado de la columna de cadmio, se aconseja que las matrices correspondientes a aguas residuales doméstico e industriales, previo al análisis se diluyan 1 en 10.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Dependiendo de las muestras a analizar, se sugiere la preparación de al menos 5 puntos (más el blanco) siguiendo la siguiente tabla:

| Estándar de trabajo (Preparar diariamente) | A | B | C | D | E | F | G |
|--|------|-------|-----|------|------|-------|------|
| (mg N/L) | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,06 |
| Pesar (g) de la Sol Stock y diluir a un peso final de 50 g con agua DI | 4,5 | 1,125 | | | | | |
| Pesar (g) del estándar By diluir a un peso final de 50 g con agua DI | | | 10 | 5,00 | 2,50 | 1,25 | 0,6 |

Nota 4: Se asume densidad de las muestras 1 g/mL.

Nota 5: Los reactivos y estándares deben estar a temperatura ambiente previo a su utilización en el equipo de FIA.

10.2. Encender y dejar estabilizar el Equipo FIA según INE 78 y seguir las instrucciones allí detalladas.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Colocar las muestras en el orden establecido según registro en el programa correspondiente. Registrar la toma de muestra y volumen final si corresponde, en RIN 33.

11.2. Colocar los estándares y muestras en la gradilla del equipo comenzando de adelante hacia atrás y de izquierda a derecha, colocando en la primera posición el estándar más concentrado (ver INE 78).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El equipo realiza el análisis de la curva de calibración. Se debe chequear que la integración realizada por el equipo satisfaga al analista.

12.2. Obtener el reporte de resultados de acuerdo al INE 78.

12.3. Correr la misma serie de muestras, pero utilizando estándares de nitrito y sin la columna de cadmio (Off-line), de forma de determinar la concentración de nitrito de las muestras (ver SOP 85). Esta concentración debe restarse al valor obtenido de la corrida de nitrato+nitrito, determinando de esta forma el valor real de la concentración nitrato de las muestras. Ver nota 7.

$$\text{Concentración NO}_3 \text{ (mg-N/L)} = \text{Concentración NO}_2 + \text{NO}_3 \text{ (mg-N/L)} - \text{Concentración NO}_2 \text{ (mg-N/L)}$$

Nota 6: Si no se realiza la determinación de nitrito según 12.3, es posible obtener el dato de NO₃ + NO₂ e informar el resultado como estos dos parámetros combinados.

Nota 7: Si $NO_3 + NO_2 < LC$, se informa $NO_3 < LC$ sin analizar NO_2

Si $NO_2 < LC$, se calcula $(NO_3 + NO_2 - LD NO_2)$, se informa NO_3 como el valor obtenido matemáticamente.

Si $NO_2 < LD$, se informa $NO_3 = NO_3 + NO_2$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la exactitud: Realizar una toma de la solución control 8.6, de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia, aceptándose entre un 80-120 % de recuperación.

13.2. Porcentaje de recuperación: Se deben adicionar los efluentes industriales y una de cada cinco muestras de agua, de forma de verificar el efecto matriz de las muestras en caso de detectar anomalías en los registros de análisis. La solución utilizada para fortificar deberá ser independiente de la utilizada para la curva de calibración.

Calcular el porcentaje de recuperación, según:

$$\% R = (C \text{ final} - C \text{ inicial}) / C \text{ adicionada}$$

donde:

C final: corresponde a la concentración obtenida en la muestra adicionada.

C inicial: corresponde a la concentración de la muestra sin adicionar.

C adicionada: corresponde a la concentración de la dilución de la solución utilizada para fortificar.

Se acepta entre 80-120 % de recuperación. En caso de no obtener resultados satisfactorios evaluar la repetición del análisis.

13.3 Control de la precisión: Se debe realizar el análisis por duplicado una de cada 5 muestras de aguas y todas las muestras de efluentes industriales. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondientes. Los límites de aceptación quedan fijados por los gráficos de control correspondiente. Mientras no se cuente con un gráfico de control se acepta hasta 5 % de dispersión entre duplicados (expresado como rango normalizado).

13.4 Control de la eficiencia de la columna de cadmio: se debe correr en la corrida de Nitrato un estándar de concentración conocida de nitrato y un estándar de nitrito de la misma concentración, junto con los muestras. Calcular la eficiencia como:

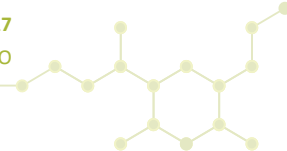
$$E = \frac{\text{Conc. } NO_3 \times 100}{\text{Conc. } NO_2}$$

donde:

Conc. NO_3 : concentración obtenida en la corrida

Conc. NO_2 : concentración obtenida en la corrida

La eficiencia debe calcularse cada día de análisis de muestras, aceptándose hasta un 90 % en la eficiencia de la columna. En caso de ser inferior, sustituir la columna de cadmio por una nueva o regenerada, siguiendo las instrucciones del FRE correspondiente.



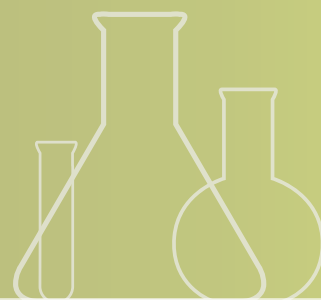
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Methods Manual Lachat, method QuickChem 10-107104-1-A
- 14.2. EPA Método N° 353.3. (1974). Nitrogen, Nitrate-Nitrite (Colorimetric, Automated, CadmiumReduction)
- 14.3. EPA Método N° 353.4. (1997). Determination of Nitrate and Nitrite in estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis.
- 14.4. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22th edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-N B In – line UV/persulfate digestion and oxidation with flow injection analysis pp. 4-105 a 4-106.
- 14.5. Norma Mexicana NMX-AA-81-1986. Contaminación del Agua-Determinación de Nitrógeno de Nitrato en Agua Marina-Método de reducción de Nitrato a Nitrito en Columna de Cadmio.



4086UY

Determinación de la concentración de Nitrito
en aguas naturales y efluentes industriales



Método colorimétrico

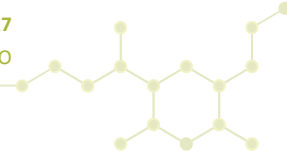
Elaborado - J.Piedrabuena

Modificado - E. Rodó

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta norma técnica se utiliza para la determinación de la concentración de nitrito (NO_2^-) en el rango aplicable de 4,6 a 1000 $\mu\text{g NO}_2^- \text{N/L}$, en aguas (incluyendo salobres o salinas) y efluentes industriales. El límite de detección es de 1,5 $\mu\text{g NO}_2^- \text{N/L}$.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 94, INE 16)
- 2.6. Instructivo de uso de resolución 0,01 g (INE 16 A, INE 16 B)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 10)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión nitrito, presenta un estado intermedio de oxidación del nitrógeno entre la oxidación a nitrato y en la reducción a amonio. Tanto la oxidación como la reducción pueden ocurrir en plantas de tratamiento de efluentes industriales, sistemas de distribución de aguas y aguas naturales.
- 3.2. Es un ión importante debido a que es el agente etiológico de la metahemoglobinemia. El ácido nitroso, el cual se forma a partir de este ión en solución ácida, puede reaccionar con aminas secundarias para formar nitrosaminas, algunas de las cuales son carcinógenas.
- 3.3. El nitrito es determinado a través de la formación de un colorante azo de color rojo púrpura formado a pH 2,0-2,5 por la reacción de sulfanilamida diazotada con N- (1-naftil)- etilendiamina dihidrocloro (NED dihidrocloro), presentando un máximo de absorción a 543 nm de longitud de onda. Altas concentraciones de NO_2^- pueden determinarse diluyendo la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. En particular la solución estándar de nitrito.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Por incompatibilidad química es improbable que coexistan NO_2^- , cloro libre y tricloro nitrógeno (NCl_3). Este último imparte un falso color rojo al agregar el reactivo colorante.
- 5.2. Los siguientes iones interfieren debido a que bajo las condiciones de reacción precipitan, por lo cual deben estar ausentes, estos son: Sb^{3+} , Au^{3+} , Bi^{3+} , Fe_{3+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , cloroplatinato (PtCl_6^{2-}) y metavanadato (VO_3^{2-}). El ión cúprico puede causar bajos resultados por catalizar la descomposición de la sal de diazonio. Iones coloreados que alteren el color del sistema deben estar ausentes.
- 5.3. Los sólidos suspendidos deben removerse por filtración utilizando filtros de membrana de 0,45 de diámetro de poro.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente); se requieren como mínimo 100 mL para la realización del análisis. Para preservar la muestra hasta por 48 h, congelar a -20°C o refrigerar a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Las muestras deben ser filtradas por filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.
- 6.2. No usar preservantes ácidos en las muestras en las que se analizará nitrito. La determinación debe hacerse lo más pronto posible sobre las muestras frescas para prevenir la conversión bacteriana de NO_2^- en NO_3^- o NH_3 .

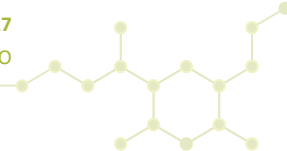
7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro que permita medida de la longitud de onda a 543 nm con paso óptico de al menos 1 cm (Spectronic 20 Genesys o similar).
- 7.2. Celdas de medición adecuadas al equipo anterior.
- 7.3. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 μL y 2,00-10,00 mL).
- 7.4. Balanza de resolución de 0,01 g (AND HF-2000Go similar).
- 7.5. Plancha térmica-magnética (Cole Parmer 4658 o similar).
- 7.6. Pastillas magnéticas para agitación.
- 7.7. Bureta de 10 mL con precisión 0,5 mL.
- 7.8. Matraces aforados de 250 y 1000 mL.
- 7.9. Pipetas aforadas de 10,00 y 25,00 mL.
- 7.10. Erlenmeyer de 250 mL.
- 7.11. Equipo de filtración para eliminar turbidez compuesto por: bomba de vacío, kitasato, embudo Buchner de 47 mm de diámetro, recipiente receptor de filtrado.
- 7.12. Filtro de membrana de 0,45 μm de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Utilizar agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente) en todas las soluciones y diluciones.
- 8.2. Reactivo colorante: verter 200 mL de agua en Erlenmeyer de 250 mL, agregar 25 mL de ácido fosfórico 85 % (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2) y 2,5 g de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ Nro. CAS 63-74-1). Luego de la disolución completa de la sulfanilamida, agregar 0,25 g de N-(1 naftil)-etilendiamina dihidroclorohidrato ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ Nro. CAS 1465-25-4). Colocar en el ultrasonido para una mejor disolución, luego llevar a 250 mL con agua desionizada. Almacenar en botella color ámbar $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$). Esta solución es estable por un mes.
- 8.3. Solución estándar de oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ Nro. CAS 62-76-0); 0,025 M (0,05 N): pesar 3,350 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ patrón primario, disolver con agua en matraz aforado de 1000 mL, agitar hasta disolución, y luego enrasar.
- 8.4. Solución estándar de permanganato de potasio (KMnO_4 Nro. CAS 7722-64-7), 0,05 N: pesar 1,60 g de KMnO_4 disolver con agua desionizada, agitar hasta disolución y llevar a 1000 mL. Mantener en un frasco color ámbar cerrado en reposo por una semana. Cuidadosamente retire el sobrenadante pipeteando sin agitación. Como el KMnO_4 no es patrón primario se debe valorar contra la solución estándar de oxalato (ver 8.3).
- 8.5. Solución stock de nitrito: estándar comercial (de alrededor de 1400 mg NO_2^- N/L de concentración con valor certificado) o preparar la solución utilizando nitrito de sodio (NaNO_2 Nro. CAS 7632-00-0) grado reactivo 99 % de pureza.
Para determinar el contenido de NaNO_2 adicionar una cantidad conocida de la solución del estándar de KMnO_4 (ver Valoración de soluciones) y reducir el color del permanganato adicionando una cantidad conocida del estándar reductor de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (0,025 M) y titular con la solución estándar de permanganato.
- 8.6. Preparación de la solución stock de nitrito a partir de NaNO_2 : disolver 1,232 g de NaNO_2 en agua desionizada y diluir a 1000 mL (1,00g = 250 μg de N). Preservar con 1 mL de cloroformo (CHCl_3 Nro. CAS 67-66-3). Esta solución debe ser valorada (ver: Valoración de soluciones).
- 8.7. Solución intermedia de nitrito: calcular el volumen, V, de la solución stock de NO_2^- a diluir de forma tal de obtener una solución final cuya concentración corresponda 1,00 mL de solución = 50 μg N. Para estándar comercial de 1400 mg NO_2^- N/L, tomar 0,1 mL de esta solución y llevar a 100 mL con agua. Preparar diariamente.
- 8.8. Solución estándar de nitrito: diluir 2,00 mL de la solución intermedia NO_2^- a 1000 mL con agua desionizada, 1,00 mL = 0,100 μg N (o sea 100 μg NO_2^- N /L). Para estándar comercial de 1400 mg NO_2^- N/L tomar 7,15 mL de solución intermedia de nitrito y diluir a 100 mL con agua (concentración: 100 μg NO_2^- N /L). Preparar diariamente.
- 8.9. Ácido clorhídrico 1 N (HCl Nro. CAS 7647-01-0)
- 8.10. Hidróxido de amonio 1 N (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.



Valoración de soluciones

Valoración de la solución titulante de KMnO_4 : Pesar entre 100-200 mg de oxalato de sodio con precisión de 0,1 mg, dentro de una Erlenmeyer de 400 mL. Adicionar 100 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Agregar 10 mL de ácido sulfúrico (1+1) y calentar rápidamente hasta 90-95 °C. Colocar adecuadamente para la valoración, una bureta 10 mL, con solución de KMnO_4 , (la bureta debe estar sobre la plancha térmica). Cuando la temperatura de la solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ es la adecuada, valorar gota a gota con agitación continua, hasta viraje de incoloro a rosado que persista por 1 minuto. La temperatura de la muestra no debe caer por debajo de los 85 °C. Titular un blanco con agua desionizada y H_2SO_4 en las mismas condiciones. El gasto estimado es de 6,0 mL de solución por cada 100 mg.

Valoración de la solución Stock de NO_2^- : Pipetear en orden: 10,00 mL de KMnO_4 0,01 M, agregar en un Erlenmeyer de 125 mL, agregarle 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Agregar 10,00 mL de solución stock de NO_2^- . Sumergir la punta de la pipeta por debajo de la superficie de la solución ácida de permanganato. Agitar vigorosamente y colocarlo en una plancha térmica en el rango de 70-80 °C. Adicionar porciones de 10 mL del estándar de oxalato de sodio 0,025 M hasta que desaparezca el color del permanganato. Titular el exceso $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ con permanganato (0,01 M) hasta el viraje a rosado el cual es el fin de la reacción. Titular un blanco con agua desionizada en las mismas condiciones.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo. Si esto no es posible, preservar la muestra en heladera ≤ 6 °C (> 0 °C) o en freezer por 48 h a partir de realizado el muestreo.
- 9.2. Se debe leer la absorbancia entre los 10 minutos y 2 horas de haber agregado el reactivo colorante.
- 9.3. Se recomienda verificar el pH de la muestra luego de haber agregado 1 mL reactivo colorante. Si el pH no se encuentra entre 2,0 y 2,5, entonces agregar menos reactivo colorante hasta que el pH sea el deseado. La curva de calibración debe ser preparada con el mismo volumen de reactivo colorante.
- 9.4. En la valoración de la solución estándar tanto cuando le agregamos ácido como cuando se calienta la solución, se debe colocar un papel de aluminio en la boca del Erlenmeyer para minimizar las pérdidas de sustancias volátiles.
- 9.5. Remover los sólidos suspendidos de la muestra por filtración utilizando filtro de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Curva de calibración

10.1. Preparar una curva de calibración de por lo menos 4 estándares dentro del rango de 5 - 100 $\mu\text{g NO}_2^-$ N/L a partir de una solución estándar de nitrito de 100 $\mu\text{g NO}_2^-$ N/L.

| Vol. de Solución estándar mL | Volumen final | Concentración en $\mu\text{g NO}_2^-$ N/L |
|------------------------------|---------------|---|
| 0,00 | 25 | 0 |
| 1,25 | 25 | 5 |
| 2,50 | 25 | 10 |
| 5,00 | 25 | 20 |
| 12,50 | 25 | 50 |
| 25,00 | 25 | 100 |

10.2. A partir de la solución estándar de nitrito, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados deben ser tomados con pipeta automática de volumen variable 1-10 mL, material aforado o por pesada con precisión 0,01 g, registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL.

10.3. Leer la absorbancia blanco (antes del agregado del reactivo de color) de todos los tubos conteniendo las soluciones de la curva de calibración.

10.4. Agregar 1,0 mL de reactivo colorante a cada estándar, mezclar. Leer la absorbancia a 543 nm entre los 10 minutos y las 2 horas de agregado el reactivo colorante.

10.5. Realizar la gráfica a (Abs. Standard- Abs. Bco.) en función de la concentración de nitrito $\mu\text{g NO}_2^-$ N/L.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Si la muestra presenta turbidez filtrar con filtro de tamaño de poro de 0,45 μm . Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9 ajustar el pH al dicho rango, gota a gota, con HCl 1N o NH_4OH 1N según corresponda.
- 11.2. Pesar 25,00 g de muestra o una alícuota de la misma y llevar a 25,00 g.
- 11.3. Medir la absorbancia a 543 nm previo al agregado del reactivo colorante (Absorbancia cero).
- 11.4. Agregar 1,0 mL de reactivo colorante a la muestra, mezclar. Leer la absorbancia a 543 nm entre los 10 minutos y las 2 horas de agregado el reactivo colorante.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Concentración de la solución de KMnO_4 en normalidad:

$$\text{KMnO}_4, \text{ eq/L} = \frac{\text{g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(\text{A} - \text{B}) \times 0,067}$$

donde:

A: corresponde a mL titulados por muestra

B: corresponde a mL titulados por Blanco

- 12.2. Concentración de la solución stock nitrito en $\text{mg NO}_2^-/\text{L}$

$$\text{Solución stock, mg NO}_2^- \text{ N/L} = \frac{[(\text{B} \times \text{C}) - (\text{D} \times \text{E})] \times 7}{\text{F}}$$

donde:

B: corresponde a mL totales del estándar de KMnO_4 usados en la titulación de la solución de NaNO_2 . (10,00mL de toma más el gasto de titulación)

C: corresponde a la normalidad del estándar de KMnO_4

D: corresponde a mL de la solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ agregados

E: corresponde a la normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$

F: corresponde al volumen en mL de la solución stock de NaNO_2 utilizada en la titulación

Nota 2: Cada 1,00 mL de KMnO_4 0,01 M (0,05 N) consumido por la solución de NaNO_2 corresponde a 1750 $\mu\text{g NO}_2^- \text{ N}$.

- 12.3. La curva de calibración está representada por la siguiente curva lineal:

$$(\text{Abs}_{\text{estándar}} - \text{Abs}_{\text{cero}}) = a \times (\mu\text{g NO}_2^- \text{ N/L}) + b$$

donde:

a y b: corresponden a la pendiente y la ordenada en el origen de la curva de calibración

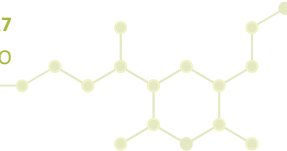
- 12.4. La concentración de nitrito se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Nitrito, } \mu\text{g NO}_2^- \text{ N/L} = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{cero}} - b) \times \text{FD}}{a}$$

donde:

FD: es el factor de dilución de la muestra

En caso de que no fue medida la Abs_{cero} de la muestra sustituir este valor por la $\text{Abs}_{\text{blanco}}$.



13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar un duplicado cada tres muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos Normalizados correspondientes, de lo contrario repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico). La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos.
- 13.2. **Control de la exactitud:** Tomar una cantidad determinada de la solución de “Control de Nitrito” (elaborada por el Responsable de Calidad o solución comercial) de manera que se encuentre ubicada su concentración en el centro de la curva de calibración, para procesar simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.3. **Fortificación:** fortificar todas las muestras de matriz efluente industrial y 1 de cada 5 de las muestras matriz agua. Se debe comparar el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

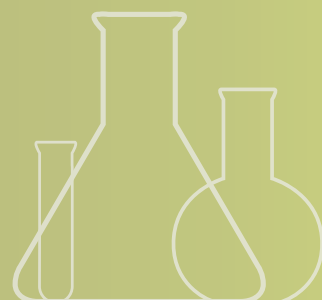
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 – NO₂⁻: A Nitrite Introduction and 4500 NO₂⁻: B Colorimetric Method pp. 4-120 a 4-121.



4087UY

Determinación de la concentración de nitrito en aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales



Método FIA

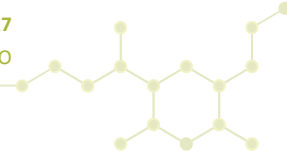
Elaborado - E. Rodó

Modificado - S. Deus Alvarez

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Fisicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrito en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrito en un rango de 0,05 - 20 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra. Limite de detección 10 µg N/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15 y INE 16)
- 2.6. Instructivo de uso del FIAS (INE 78)
- 2.7. Ruta de análisis (RIN 33)
- 2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 28)
- 2.9. Instructivo para el uso del destilador (INE 36)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El ión nitrito, presenta un estado intermedio de oxidación del nitrógeno entre la oxidación a nitrato y en la reducción a amonio. Tanto la oxidación como la reducción pueden ocurrir en plantas de tratamiento de efluentes industriales, sistemas de distribución de aguas y aguas naturales.
- 3.2. Es un ión importante debido a que es el agente etiológico de la metahemoglobinemias. El ácido nitroso, el cual se forma a partir de este ión en solución ácida, puede reaccionar con aminas secundarias para formar nitrosaminas, algunas de las cuales son carcinógenas.
- 3.3. El nitrito es determinado mediante la formación de un compuesto azo de color rojo por la reacción con sulfanilamidiazotada y N - (1 - naftil) - etilendiaminadihidrocloro (NED dihidricloro). El compuesto formado, altamente coloreado, es medido espectrofotométricamente 520 nm de longitud de onda.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica y guantes. En caso de ser necesario, utilizar gafas de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. En particular la solución estándar de nitrito.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Por incompatibilidad química es improbable que coexistan NO_2^- , cloro libre, y tricloro nitrógeno (NCl_3). Este último imparte un falso color rojo al agregar el reactivo colorante.
- 5.2. Los sólidos suspendidos deben removerse por filtración utilizando filtros de membrana de 0,45 de diámetro de poro.
- 5.3. La muestra deberá presentar un pH entre 7 y 9, por lo que si no se encuentra en este rango, deberá ajustarse con HCl o NaOH, según corresponda
- 5.4. Pueden obtenerse bajos resultados con muestras que presenten altas concentraciones de hierro, cobre u otros metales. En el presente método, el EDTA es añadido al buffer de forma de reducir este tipo de interferencia.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar en frasco de plástico o vidrio. Se requiere al menos 100 mL de muestra para realizar el análisis.
- 6.2. No usar preservantes ácidos en las muestras en las que se analizará nitrito. La determinación debe hacerse lo más pronto posible sobre las muestras frescas para prevenir la conversión bacteriana de NO_2^- en NO_3^- o NH_3 . En caso de ser necesario ampliar el margen, mantener a temperatura $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$) y analizar dentro de las 48 horas de extraída la muestra.

- 6.3. Las muestras deben ser prefiltradas si concentración de los sólidos suspendidos pudiera afectar el flujo del análisis en la unidad FIA. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin filtración previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de inyección de flujo diseñado para tomar y reaccionar con la muestra y reactivos en el orden y en las proporciones requeridas (INE 78)
- Autosampler (FQ 328)
 - Bomba multicanal (FQ 329)
 - Unidad de reacción o Manifold (FQ 330)
 - Detector colorimétrico (FQ 317)
 - Sistema de datos OMNIOM 3,0
 - Celda de flujo de vidrio de 10 mm y 80 µl
- 7.2. Balanza analítica con precisión de 0,001 g (Precisa 205A o similar) (INE 15)
- 7.3. Matraces aforado de 1000 mL
- 7.4. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 500 mL
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 µL) y (2,00 – 10,00 mL)
- 7.6. Balanza con resolución de 0,01 g (AND HF-2000Go similar) (INE 16)
- 7.7. Equipo de filtración para eliminar turbidez compuesto por: bomba de vacío, kitasato, embudo Buchner de 47 mm de diámetro, recipiente receptor de filtrado.
- 7.8. Filtro de membrana de 0,45 µm de poro.

8. REACTIVOS

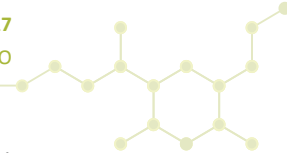
- 8.1. Utilizar agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 versión vigente) en todas las soluciones y diluciones.
- 8.2. Hidróxido de sodio 15 N (NaOH Nro. CAS 1310-73-2): Disolver lentamente 150 g de NaOH en 250 mL de agua desionizada en recipiente de vidrio. Agitar con agitador magnético hasta disolver completamente. Se debe tener precaución ya que esta solución libera calor por ser exotérmica. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, almacenar en botella de plástico.
- 8.3. Buffer de cloruro de amonio (NH₄Cl Nro. CAS 12125 -02-9), opción 1: en un recipiente de 1 L de capacidad, agregar 85 g de cloruro de amonio, 1,0 g de EDTA disódicodihidratado (Na₂EDTA.2H₂O Nro. CAS 6381-92-6) y 938 g de agua desionizada (DI). Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8.5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N.
- 8.4. Buffer de cloruro de amonio, opción 2: en un recipiente de 1 L agregar 800 g agua desionizada, 126 g de ácido clorhídrico concentrado (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 85 g de cloruro de amonio y 1,0 g de EDTA disódicodihidratado. Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8,5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N o HCl.

Nota 1: El cloruro de amonio utilizado en el buffer 8.3 puede llegar a presentar contaminación con nitrato, si se observan cambios en los blancos de reactivos, se sugiere utilizar el buffer 8.4.

- 8.5. Reactivo colorante: añadir a un recipiente de capacidad 1 L color ámbar 876 g de agua desionizada, 170 g de ácido ortofosfórico 85 % (H₃PO₄ Nro. CAS 7664-38-2), 40,0 g de sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S Nro. CAS 63-74-1) y 1,0 g de N-(1 naftil)- etilendiaminadihidrocloro (NED C₁₂H₁₄N₂.2HCl Nro. CAS 1465-25-4). Agitar utilizando agitador magnético durante 30 minutos hasta disolver. Esta solución es estable durante un mes.

Nota 2: Todos los reactivos deben ser almacenados en recipientes de vidrio, provistos de etiquetas con el nombre del reactivo, fecha de preparación e iniciales del analista responsable de la preparación.

- 8.6. Solución stock de nitrito: Estándar comercial (de alrededor de 1000 mg NO₂/L de concentración con valor certificado) o preparar la solución utilizando nitrito de sodio (NaNO₂ Nro. CAS 7631-99-4 grado reactivo 99 % de pureza).



Para determinar el contenido de NaNO_2 adicionar una cantidad conocida de la solución del estándar de permanganato de potasio (KMnO_4 Nro. CAS 7722-64-7 - ver valoración de soluciones) y reducir el color del permanganato adicionando una cantidad conocida del estándar reductor de oxalato de sodio 0,025 M ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ Nro. CAS 62-76-0) y titular con la solución estándar de permanganato.

- 8.7. Preparación de la solución stock de nitrito a partir de NaNO_2 : disolver 1,232 g de NaNO_2 en agua desionizada y diluir a 1000 mL (1,00 g = 250 μg de N). Preservar con 1 mL de cloroformo (CHCl_3 67-66-3). Esta solución debe ser valorada (ver: valoración de soluciones).
- 8.8. Solución intermedia de nitrito: Evaluar la pertinencia de requerir esta solución. En caso necesario, preparar diariamente.
- 8.9. Ácido clorhídrico 1 N
- 8.10. Hidróxido de amonio 1 N (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6)

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

Valoración de soluciones

Valoración de la solución titulante de KMnO_4 : Pesar entre 100-200 mg de oxalato de sodio con precisión de 0,1 mg, dentro de un Erlenmeyer de 400 mL. Adicionar 100 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Agregar 10 mL de ácido sulfúrico (1+1) y calentar rápidamente hasta 90 – 95 °C. Colocar adecuadamente para la valoración, una bureta 10 mL, con solución de KMnO_4 , (la bureta debe estar sobre la plancha térmica), cuando la temperatura de la solución de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ es la adecuada, valorar gota a gota con agitación continua, hasta viraje de incoloro a rosado que persista por 1 minuto. La temperatura de la muestra no debe caer por debajo de los 85 °C. Titular un blanco con agua desionizada y ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) en las mismas condiciones. El gasto estimado es de 6,0 mL de solución por cada 100 mg.

Valoración de la solución Stock de NO_2^- : Pipetear en orden, 10,00 mL de KMnO_4 0,01 M, agregar en un Erlenmeyer de 125 mL, agregarle 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Agregar 10,00 mL de solución stock de NO_2^- . Sumergir la punta de la pipeta por debajo de la superficie de la solución ácida de permanganato. Agitar vigorosamente y colocarlo en una plancha térmica en el rango de 70 – 80 °C. Adicionar porciones de 10 mL del estándar de oxalato de sodio 0,025 M hasta que desaparezca el color del permanganato. Titular el exceso $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ con permanganato (0,01 M) hasta el viraje a rosado el cual es el fin de la reacción. Titular un blanco con agua desionizada en las mismas condiciones.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo. Si esto no es posible, preservar la muestra en heladera a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C) por 48 h a partir de realizado el muestreo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Curva de calibración

- 10.1. Dependiendo de las muestras a analizar, se sugiere la preparación de al menos 5 puntos (más el blanco) siguiendo la siguiente tabla:

| Estándar de trabajo (Preparar diariamente) (mg N/L) | A | B | C | D | E | F | G |
|--|------|-----|-----|-----|------|-------|------|
| | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,05 |
| Pesar (g) de la Sol Stock y diluir a un peso final de 50 g con agua DI | 3,3 | 0,8 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Pesar (g) del estándar By diluir a un peso final de 50 g con agua DI | --- | --- | 10 | 5,0 | 2,5 | 1,25 | 0,5 |

Nota 4: Se asume densidad de las muestras 1 g/mL.

Nota 5: Los reactivos y estándares deben estar a temperatura ambiente previo a su utilización en el equipo de FIA.

Nota 6: No es posible prescindir de la solución G.

10.2. Encender y dejar estabilizar el Equipo FIA según INE78 y seguir las instrucciones allí detalladas.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Si la muestra presenta turbidez filtrar con filtro de tamaño de poro de 0,45 µm. Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9 ajustar el pH al dicho rango, gota a gota, con HCl 1 N o NH₄OH 1 N según corresponda.

11.2. Colocar las muestras en el orden establecido según registro en el programa correspondiente. Registrar la toma de muestra y volumen final si corresponde, en RIN 33.

Colocar los estándares y muestras en la gradilla del equipo comenzando de adelante hacia atrás y de izquierda a derecha, colocando en la primera posición el estándar más concentrado (ver INE 78).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El equipo realiza el análisis de la curva de calibración. Se debe chequear que la integración realizada por el equipo satisfaga al analista.

12.2. Obtener el reporte de resultados de acuerdo al INE 79.

12.3. Se debe correr sin la columna de cadmio (Off-line), de forma de determinar la concentración de nitrito de las muestras.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cuando los resultados de los controles no se encuentren dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición de los análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.1. **Control de la exactitud:** tomar la cantidad necesaria de la solución de concentración conocida de "Nitrito" (elaborada por el Responsable de Calidad o solución comercial). Realizar la toma de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia, aceptándose entre un 80 – 120 % de recuperación.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado una de cada 5 muestras de aguas y todas las de muestras efluentes industriales. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondientes. Mientras no se cuente con un gráfico de control se acepta hasta 5 % de dispersión entre duplicados (expresado como rango normalizado).

13.3. **% de recuperación:** Correr la muestra con y sin adición de estándar. Calcular el porcentaje de recuperación, de acuerdo:

$$\% R = C \text{ final} - C \text{ inicial} / C \text{ adicionada}$$

Se deben adicionar todos los efluentes industriales y una de cada cinco muestras de agua, de forma de verificar el efecto matriz. Se acepta entre 80 – 120 % de recuperación.

14. BIBLIOGRAFÍA

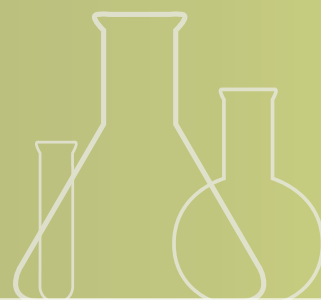
14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 – NO₃- E Cadmium reduction method pp. 4-125 a 4-127.

14.2. Methods Manual Lachat, method QuickChem 10-107104-1-A

14.3. EPA Método N° 353.3. (1974). Nitrogen, Nitrate-Nitrite (Colorimetric, Automated, Cadmium Reduction)

4090UY

Determinación de nitrógeno total Kjeldahl
en aguas y efluentes



Flow Injection Analysis (FIA)

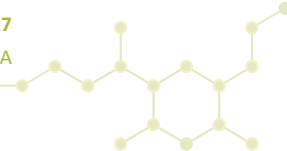
Elaborado - C. Grau

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físicoquímico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de (0,84 –1750) mg N/L y el rango lineal (0,84 – 35) mg N/L. El límite de detección es de 0,28 mg N/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 111)
- 2.6. Instructivo de uso del digestor BD 40 (INE 112)
- 2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16A e INE 16B)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 34 y RFQ 35)
- 2.9. Planillas de cálculo electrónicas
- 2.10. Instructivos de uso del destilador y desionizador de agua (INE 28, INE 36, INE 82 e INE 109)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método colorimétrico se basa en reacciones que son específicas para el ion de amonio. La digestión convierte las formas orgánicas de nitrógeno en la forma de amonio, la cual se mide a 660 nm.

Las muestras se digieren en presencia de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4), y sulfato de cobre ($CuSO_4$). El residuo se enfría, se diluye con agua y se analiza como amoníaco.

Nitrógeno Total Kjeldahl es la suma de los compuestos libres de amoníaco y de nitrógeno orgánico que se convierten en sulfato de amonio (NH_4) $_2$ SO $_4$, bajo las condiciones de la digestión descripta.

La muestra es inyectada en la placa donde su pH se controla elevando a un pH básico conocido con un tampón concentrado. Esta neutralización en línea convierte el catión de amonio en amoníaco, y también evita la influencia indebida de la matriz de ácido sulfúrico en la reacción de color sensible al pH que sigue.

El amoníaco producido se calienta luego con salicilato e hipoclorito para producir un color azul, que es proporcional a la concentración de amoníaco. El color se intensifica mediante la adición de nitroprusiato de sodio.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requiere túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Prestar especial cuidado con posibles proyecciones en el momento del agregado de agua desionizada luego de digerida la muestra.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Durante la digestión de Nitrógeno Total Kjeldahl, si la muestra tiene un contenido de NO_3 superior a 10 mg N/L, éste puede oxidar una porción del amoníaco liberado del N_{org} digerido, produciendo N_2O y dando como resultado una interferencia negativa.
- 5.2. Cuando hay suficiente materia orgánica en un bajo estado de oxidación, el NO_3 puede reducirse a amoníaco, dando como resultado una interferencia positiva.

Las condiciones en las que se producen las interferencias significativas no están bien definidas, por lo tanto, no existe una manera comprobada de eliminar dichas interferencias para esta metodología. En cada caso particular, se deben contrastar los resultados obtenidos de amonio, NTK y nitratos para verificar la coherencia del balance de compuestos nitrogenados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar una cantidad de muestra que sea representativa (cantidad de muestra típica, 250 mL) en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar a $2\text{ }^{\circ}\text{C} - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Realizar el análisis lo antes posible, luego de realizado el muestreo.

De no ser posible, preservar la muestra a $\text{pH} < 2$ con H_2SO_4 concentrado o congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y analizarla antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza con resolución de 0,001 g, para toma de muestra y estándares.

7.2. Balanza con resolución de 0,01 g, para preparación de reactivos.

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 – 10,00) mL y (100 – 1000) μL .

7.4. Matraces Erlenmeyer de 150 mL ó 250 mL.

7.5. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold para la determinación de NTK (LCHAT QuickChem 8500 series 2 o similar)

7.6. Block de digestión

7.7. Equipo para la generación de agua desionizada

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.2. Reactivos:

Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9)

Sulfato de potasio (K_2SO_4 Nro. CAS 7778-80-5)

Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 7758-99-8)

Tartrato de sodio y potasio (D, L- $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 6381-59-5)

Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)

Fosfato de sodio (dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Nro. CAS 7782-85-6)

Salicilato de sodio (sal sódica del ácido salicílico ($[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})(\text{COO})\text{Na}]$ Nro. CAS 54-21-7)

Nitroprusiato de sodio (dihidrato nitroferricianuro sódico ($[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ Nro. CAS 13755-38-9)

Hipoclorito de sodio (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

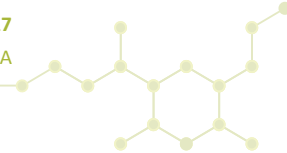
8.3. Solución de digestión:

En un matraz aforado de 1 L, con 700 mL de agua 8.1, añadir 134,0 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y 134 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Añadir 11,4 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Diluir hasta el aforo con agua 8.1 e invertir para mezclar. Mantener bien cerrado cuando no esté en uso para reducir la posibilidad de contaminación por amoníaco del ambiente. Preparar mensualmente.

8.4. Buffer:

En un recipiente de 1 L añadir 900 mL de agua 8.1, 50 g de tartrato de sodio y potasio, D, L- $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 g de hidróxido de sodio (NaOH), y 26,8 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) mezcla hasta disolver. Hervir durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y transferir a un matraz aforado de 1 L. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar. Preparar mensualmente.

Nota 2: Para reducir la posibilidad de que el tartrato de potasio sea contaminado, se recomienda que el buffer de tartrato se hierva durante 10 minutos. Para verificar que el buffer de tartrato es lo suficientemente puro, comparar la línea de base de reactivo a la línea de base de agua desionizada. La línea de base con todos los reactivos no debe tener una diferencia mayor de 0,15 V con la línea de base de agua desionizada.



8.5. Nitroprusiato - Salicilato:

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L disolver 150,0 g de salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico, $C_6H_4(OH)(COO)Na$], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidrato nitroferriicianuro sódico, $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$] en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta la marca e invertir para mezclar. Guarde en un frasco oscuro y preparar mensualmente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

Preparación por Peso:

En un frasco de vidrio ámbar del 1 L agregar 150.0 g salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico, $C_6H_4(OH)(COO)Na$], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidrato nitroferriicianuro sódico, $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$] en 908 g de agua 8.1. Agitar hasta disolver. Preparar mensual-mente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

8.6. Hipoclorito de sodio (100 mL/L):

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 250 mL, diluir 25,0 mL de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl), hasta la marca con agua 8.1. Invertir para mezclar. Preparar diariamente.

Preparación por Peso:

En un matraz de 250 mL, agregar 26,7 g de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl) y 225 g de agua 8.1. Agitar para mezclar. Preparar diariamente.

8.7. **Solución estándar de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,9095 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

8.8. **Solución control de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,9095 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

Nota 3: El reactivo utilizado para preparar tanto la solución estándar como la solución control deben ser de marcas distintas o por lo menos números de lotes distintos.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las muestras no deben consumir más del 10 % del ácido sulfúrico durante la digestión. Este consumo de ácido se puede detectar cuando se mide la densidad de la muestra digerida y se encuentran diferencias significativas entre las densidades. En caso de que esto ocurra, evaluar la posibilidad de repetir la muestra realizando una dilución mayor o estandarizar la muestra digerida con una solución de hidróxido de sodio, determinando así el excedente de ácido sulfúrico consumido en la digestión. Luego de realizada la estandarización, es necesario reanalizar la muestra con una dilución mayor.

9.2. Las digestiones deben estar libres de turbidez. Las piedras de ebullición pueden causar cierta turbidez. Para evitar que esto ocurra, hacer la toma para la medición del sobrenadante.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares de acuerdo al siguiente cuadro utilizando una balanza con resolución de 0,001 g, a partir de un estándar de 50 mg N/L, preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución 8.7:

| Masa std (g) | Masa final (g) | Concentración aprox. final (mg N/L) |
|--------------|----------------|-------------------------------------|
| 0,25 | 50 | 0,25 |
| 0,75 | 50 | 0,75 |
| 1,5 | 50 | 1,5 |
| 5,0 | 50 | 5,0 |
| 10,0 | 50 | 10,0 |
| 17,5 | 50 | 17,5 |
| 25,0 | 50 | 25,0 |
| 35,0 | 50 | 35,0 |

10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de un material de referencia certificado o partir de la solución 8.8, de acuerdo a la siguiente dilución:

| Concentración Std (mg N/L) | Masa solución control (g) | Masa final (g) | Concentración aprox. final (mg N/L) |
|----------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 500 | 1,0 | 50 | 10 |

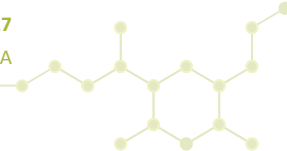
Nota 4: Se asume una densidad de 1 g/mL.

Nota 5: Preservar los estándares de la curva, blancos y control con 2 mL/L de H₂SO₄ concentrado. Los estándares, blancos y control pueden ser almacenados por 28 días.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Digestión de la muestra (muestras, curva de calibración, blancos y controles de calidad):

- 11.1.1. Las muestras, estándares, blancos y controles de calidad deben estar previamente preservados con H₂SO₄ conc (2 mL/L).
- 11.1.2. Para efluentes se realizará una dilución previa a la digestión de 10 veces aproximadamente. Registrar la toma de la muestra y la masa final de la dilución. Las muestras de aguas se analizan sin dilución previa.
- 11.1.3. Colocar piedras de ebullición en el tubo para digestión, tarar la balanza y registrar el peso del tubo en el RFQ 34 o RFQ 35 según corresponda.
- 11.1.4. Sin tarar la balanza realizar una toma de aproximadamente 25 mL y registrar el peso.
- 11.1.5. Agregar en cada tubo 10 mL de solución de digestión con pipeta automática.
- 11.1.6. Colocar todos los tubos en el block de digestión Lachat BD-40, encender el equipo y seleccionar el programa deseado (el programa utilizado es DIG_NTK 3). Verificar que las condiciones de digestión sean las siguientes: Paso 1 a 150 °C, T rampa 30 minutos, Ta estable 60 minutos, Paso 2 a 250 °C, T rampa 30 minutos, Ta estable 60 minutos, Paso 3 a 390 °C, T rampa 50 minutos, Ta estable 30 minutos.
- 11.1.7. Finalizada la digestión, retirar la gradilla con los tubos del digestor y colocarlos en el soporte para enfriar, antes de pasados 10 minutos, agregar una pequeña cantidad de agua desionizada 8.1 en cada tubo para evitar la formación de material sólido.
- 11.1.8. Cuando el digerido alcance temperatura ambiente, llevar a 25 mL con agua desionizada 8.1 y registrar el peso del tubo. Homogeneizar utilizando un vórtex.
- 11.1.9. Medir la densidad de la curva de calibración, blancos, controles y muestras, pesando 1 mL del digerido con pipeta automática calibrada. Registrar el peso.



Nota 4: Los estándares de la curva de calibración tienen una vigencia de 28 días luego de la digestión, por lo que si se va a analizar muestras dentro de ese período, se utiliza esa curva de calibración ya digerida.

11.2. Determinación instrumental:

- 11.2.1 Encender el equipo de inyección en flujo.
- 11.2.2 Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.
- 11.2.3 Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos 10 minutos.
- 11.2.4 Colocar una porción de cada digerido a analizar en los tubos del rack del autosampler seguido de los estándares de la curva (de menor a mayor concentración), controles y blancos.
- 11.2.5 Verificar en el computador, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.
- 11.2.6 Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.
- 11.2.7 No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.
- 11.2.8 Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración del control y de las muestras.
- 12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no haya habido ninguna interferencia en la secuencia.
- 12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.
- 12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a las tomas de muestras realizadas, densidades correspondientes y factores de dilución. También verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

$$\text{Conc NTK (mgN/L)} = \frac{C_o \times m_{\text{muestra dirigida}} \text{ (g)} \times \text{FD}}{\text{densidad} \times m_{\text{muestra inicial}} \text{ (g)}}$$

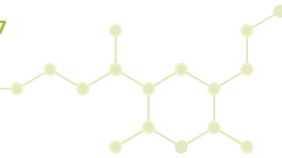
13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

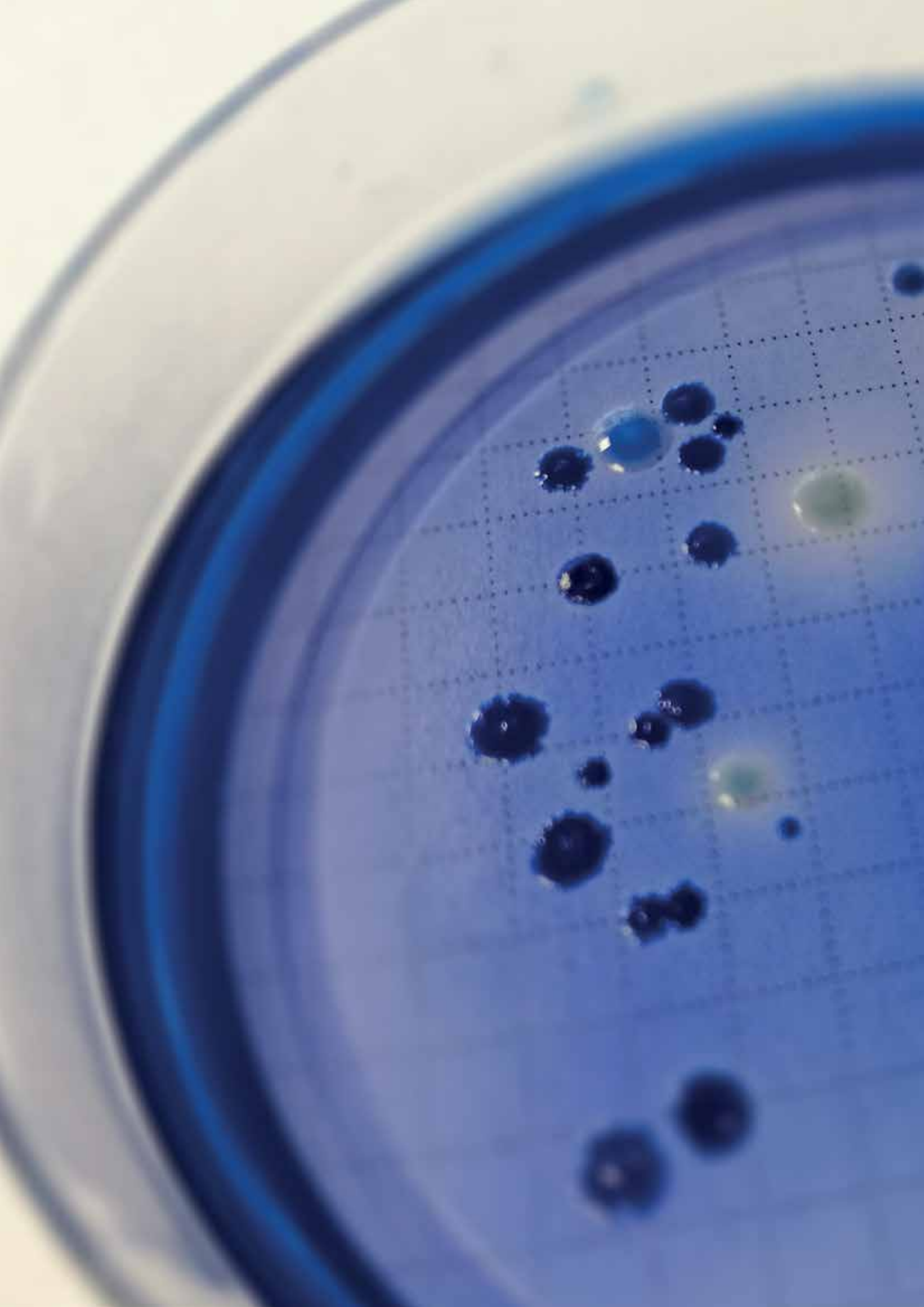
- 13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.2. Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración o al final de toda la corrida. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes, siendo 90-110 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.2. **Control de la precisión:** Analizar por duplicado una cada 5 muestras de aguas o efluentes. Mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, siendo 10% el máximo aceptado de dispersión hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.3. **Porcentaje de recuperación:** Repetir desde el punto 11.1.3 al 11.1.4. Fortificar las aguas con 100 µL y los efluentes con 250 µL con una solución de 500 mg N/L, registrar el peso. Repetir desde el punto 11.1.5 al 11.1.8. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. En el caso de los efluentes que llevan una dilución previa a la digestión, se fortifica la dilución y no la muestra original. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos

se encuentren bajo control, siendo 90-110 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

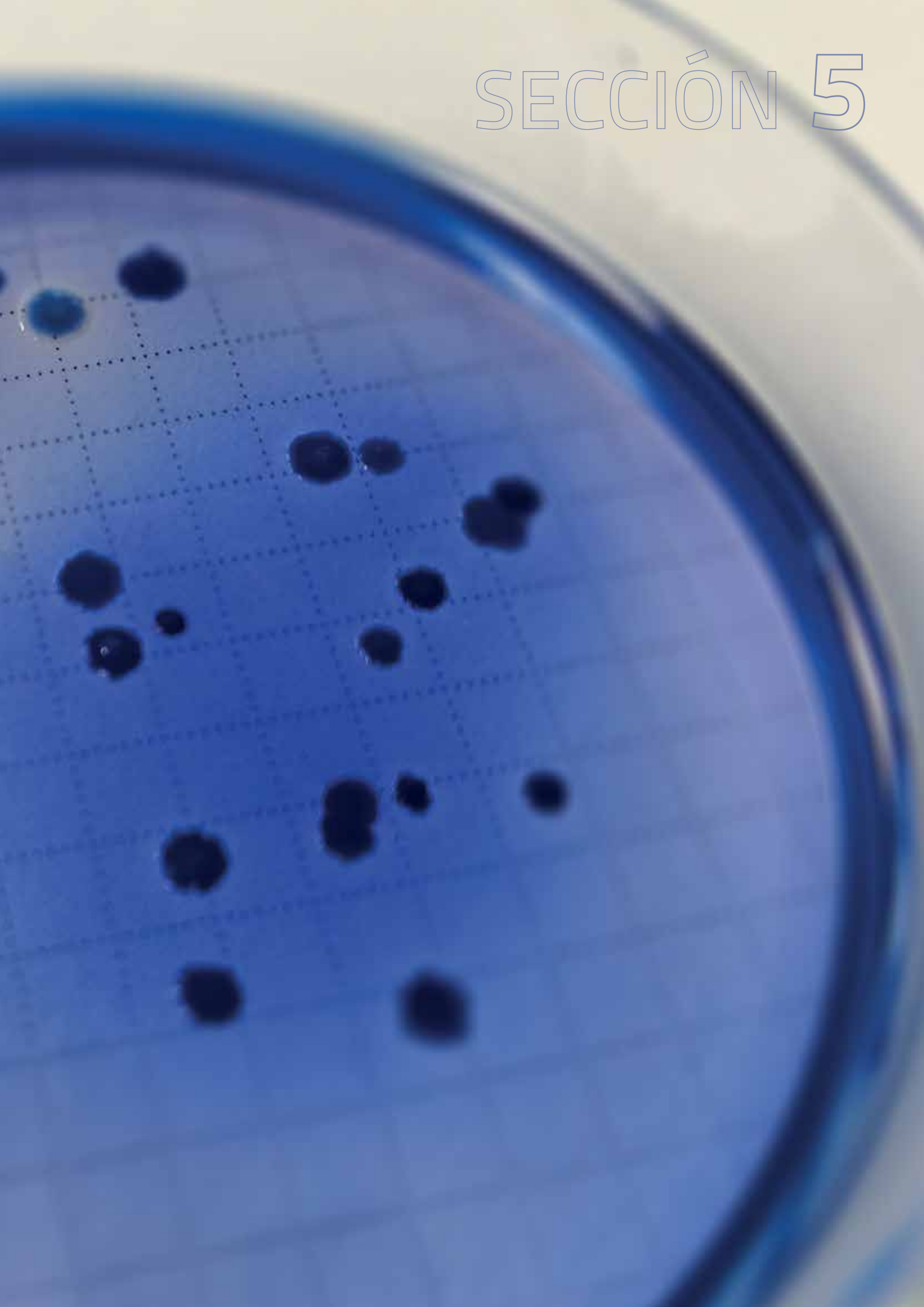
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. LCHAT, QuikChem® Method 10-107-06-2-P, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY FLOW INJECTION ANALYSIS COLORIMETRY (Cooper catalyst / block digester method).
- 14.2. EPA Method 351.2, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY, Revision 2.0, August 1993.
- 14.3. American Public Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 N_{org} A Nitrogen (organic) Introduction y 4500 Norg D Block digestion and flow injection analysis pp. 4-131 a 4-132 y 4-135 a 4-137.





SECCIÓN 5





5053UY

Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales



Técnica de filtración por membrana

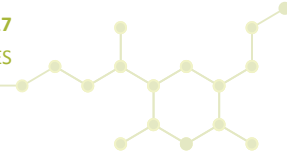
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales, superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. Es aplicable también a aguas salobres o salinas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/ 100 mL; el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”. (5072 UY)
- 2.6. Procedimiento: “Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis”. (5065 UY)
- 2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97)
- 2.9. Instructivo de uso balanza (INE 16)
- 2.10. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.14. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87)
- 2.16. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.17. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.18. Rutas de análisis (RMB 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de bacterias coliformes termotolerantes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio M-FC por 24 h \pm 2 h a 44,5 °C \pm 0,2 °C desarrollan colonias color azul.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 44,5 °C por 24 h. Este medio selectivo y la temperatura de incubación disminuyen el desarrollo de bacterias no coliformes que afectarían negativamente el crecimiento de los coliformes termotolerantes.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando túnica, anteojos de protección y guantes descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

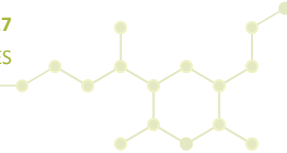
- 5.1. Aguas con gran turbidez y baja densidad de coliformes termotolerantes; presencia de tóxicos orgánicos como fenoles; existencia de una carga de bacterias no coliformes muy grande.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Referirse al SOP 5065UY, cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante. Deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra.

7. INSTRUMENTAL

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34 - 51 KPa.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Baño de agua o incubadora a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10 a 15X y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de $60\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado.
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de $0,45\text{ }\mu\text{m} \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.15. Anzas
- 7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)



8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol
- 8.3. Medio de cultivo M-FC Agar (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.4. Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri de plástico deben ser estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANALISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación del medio de cultivo

- 11.4. El medio de cultivo debe prepararse según instrucciones del fabricante en el envase, en material de vidrio estéril, sin necesidad de ser autoclavado. Disolver y fundir en horno microondas o en baño María. Hervir 1 minuto. El pH final del medio de cultivo debe ser $7,4 \pm 0,2$. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 14 días, ya sea en Erlenmeyer, frasco Schott o repartido en las placas.

Preparación de las placas de Petri

- 11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.8. Almacenar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta su utilización.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.10. Colocar 9 mL \pm 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.
- 11.11. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el

origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.

- 11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.19. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida dentro de bolsas herméticas, en el baño de agua a 44,5 °C ± 0,2 °C durante 24 h ± 2 h.

Recuento

- 11.22. Las colonias típicas de coliformes termotolerantes son de distintas tonalidades de azul. Las colonias grises o crema son consideradas como no coliformes, aunque existen colonias de E. coli atípicas que se presentan de color crema por lo que se recomienda realizar la verificación a posteriori.
- 11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

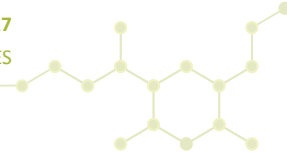
12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$C. \text{ termotolerantes (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

- 12.2. Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana, se informa como crecimiento confluyente con o sin presencia de coliformes y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.
- 12.3. Si el número de colonias típicas de coliformes termotolerantes fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.
- 12.4. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.
 - Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
 - Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.
- 12.5. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes termotolerantes, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc/100 mL, expresar como < LC (límite de cuantificación).
- 12.6. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango



aceptable. Por ejemplo si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = 30 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.7. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 0,1 mL y 0,03 mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 76.000 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.8. Interpretación de resultados: Al efectuarse la evaluación de datos, se considera que un resultado ha excedido un valor guía o estándar de calidad, cuando el límite inferior para el intervalo de confianza de la incertidumbre de la medición es mayor que tal valor.

Por ejemplo, si el valor guía es de 500 ufc/100 mL, un resultado de (500 ± 50) ufc/100 mL NO excede la guía, ya que el límite inferior (450), es menor a 500. En este ejemplo, el menor recuento que excedería la guía es 551 ufc/100 mL ± 50 ufc/100 mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALITICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:** Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el procedimiento **“Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”, 5072 UY.** Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes termotolerantes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en tripticasa soya agar (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector cada día, por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFIA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, 2012. Método 9222 D Thermotolerant Coliform Membrane Filter Procedure pp. 9-85 a pp. 9-87.

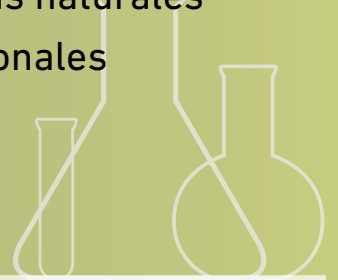
14.2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for safe recreational water environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. 2003. Genova.

14.3. DIRECTIVE 2006/7/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 767160/EEC. Official Journal of the European Union. 2006.



5054UY

Determinación de Coliformes Totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales



Técnica de filtración por membrana

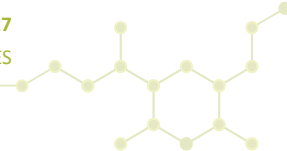
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/100 mL, y el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes totales determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista” (5071UY)
- 2.6. Procedimiento: “Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis” (5065UY)
- 2.7. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC07)
- 2.8. Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.9. Ruta de análisis (RMB 02)
- 2.10. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02)
- 2.11. Instructivo de uso de autoclaves verticales (INE 13, 86 y 97)
- 2.12. Instructivo de uso de balanza plato abierto (INE 16)
- 2.13. Instructivo de uso de cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.14. Instructivo de uso de destilador Barnstead (INE 36)
- 2.15. Instructivo de uso de desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.16. Instructivo de equipo analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.17. Instructivo de uso de agitador vórtex (INE44)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de bacterias coliformes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio m-Endo por 22 - 24 h a 35 °C ± 0,5 °C desarrollan colonias color rojo con brillo verde metálico. Estas bacterias fermentan la lactosa formando un aldehído como compuesto intermediario, el cual forma un complejo con la fucsina y el sulfito de sodio presente en el medio, lo que le da a las colonias su coloración característica.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 35 °C por 22 - 24 h. La incorporación en el medio de cultivo de determinados colorantes, permite que la producción de ácido y aldehído debido a la fermentación de la lactosa se visualice por la formación de colonias rojas con brillo verde metálico, típicas de coliformes totales.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El medio de cultivo m-Endo Agar o m-ENDO Agar LES, contienen dos componentes peligrosos para la salud: el colorante fucsina y el sulfito de sodio. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado (como 3M Particulate respirator 8247 R95 o similar).
- 4.2. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

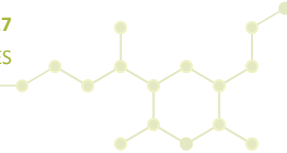
- 5.1. Aguas con gran turbidez y baja densidad de coliformes totales; presencia de tóxicos orgánicos como fenoles; existencia de una carga de bacterias no coliformes muy grande.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. **Referirse al SOP 5065UY**, cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante. Deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y sean autoclavables; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Incubadora a $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10 a 15X y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de $60\text{-}80^{\circ}$ con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado.
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de $0,45\text{ }\mu\text{m} \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL) y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.15. Anzas
- 7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)



- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol 95 %
- 8.3. Medio de cultivo m-Endo Agar o m-Endo Agar LES (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.4. Agar (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2 según ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua desionizada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri de plástico deben estar estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1%

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando. El pH final debe ser 6,8.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días y rotular el recipiente indicando, nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable.

Preparación del medio de cultivo

- 11.4. El medio de cultivo debe prepararse según instrucciones del fabricante en el envase, en material de vidrio estéril, sin necesidad de ser autoclavado. Disolver y fundir en horno microondas o en baño agua hirviendo, hasta que el agar esté disuelto (en caso de utilizar caldo m-endo, agregar agar al 1,5 % p/p). El pH final del medio de cultivo debe ser $7,2 \pm 0,2$. Dejar registro en el RPR16.
- 11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 14 días, ya sea en Erlenmeyer, frascos Schott o repartido en las placas.

Preparación de las Placas de Petri

- 11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.8. Almacenar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta su utilización.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.10. Colocar 9,0 mL de agua peptonada estéril en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio.
- 11.11. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- 11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua peptonada estéril. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10 o las diluciones realizadas. Si no se dispone de valores históricos de la muestra se recomienda filtrar tres volúmenes.
- 11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.19. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida, en la estufa de 35,0 °C ± 0,5 °C durante 22-24 h. Las aguas tratadas pueden contener microorganismos estresados que presentan crecimiento más lento, y demoran entre 22-24 h en manifestar el brillo verde metálico. Por el contrario en aguas naturales, las colonias típicas de coliformes pueden observarse entre las 16-18 h de incubación.

Recuento

- 11.22. Las colonias típicas de coliformes totales son aquellas rojas o rosado oscuro que presentan brillo verde metálico en la superficie ya sea como un pequeño punto o en toda la superficie de la colonia. Las colonias que no presentan brillo, pudiendo ser rojas, rosadas, blancas o sin color son consideradas como no coliformes.
- 11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 80 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

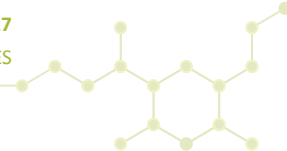
- 12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$C. \text{ totales (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc: corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

- 12.2. Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana se informa como crecimiento confluyente con o sin



presencia de coliformes y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.

12.3. Si el número de colonias típicas de coliformes totales fuera entre 20 y 80 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.

12.4. Si el número de colonias típicas es mayor a 80, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.

Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.

Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

12.5. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes totales, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc, expresar como <LC.

12.6. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = 30 \text{ coliformes /100 mL}$$

12.7. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 0,1 y 0,03 mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78+21) \times 100}{(0,1+0,03)} = 76.000 \text{ coliformes /100 mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:** Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora)

Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el Procedimiento Normalizado de Operación para la Verificación de Coliformes Totales (5071 UY). Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones, aislar las colonias en tripticosa soya agar (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

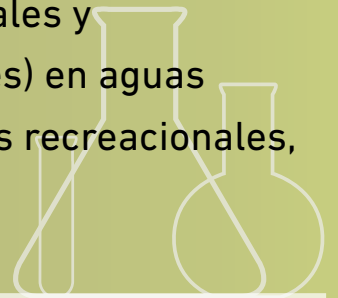
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9222 B Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure pp. 9-78 a 9-83
- 14.2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for safe recreational water environments. Vol 1: Coastal and fresh waters. 2003. Genova.

5055UY

Determinación simultánea de Coliformes Totales y *Escherichia coli* (o coliformes termotolerantes) en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales, y aguas residuales domésticas e industriales

Sustrato definido, Colilert®-18



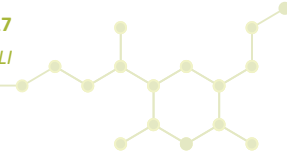
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales, y aguas residuales domésticas e industriales, obteniendo resultados en 18-22 horas, al incubar a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- 1.2. Cuando se incuba a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$, se puede también determinar coliformes termotolerantes.
- 1.3. El límite de cuantificación, al igual que el límite de detección, es de 1 NMP/100 mL.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.7. Instructivo de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97)
- 2.8. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.9. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.10. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.11. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.12. Instructivo de uso vórtex (INE44)
- 2.13. Instructivo de uso sellador Quanti-Tray (INE 43)
- 2.14. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87), en el caso que se quiera determinar este parámetro.
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 05)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra de agua un reactivo específico, e incubar la muestra durante 18-22 horas.

Cuando se incuba a 35 °C Colilert-18 detecta simultáneamente los coliformes totales y *E. coli* presentes en el agua. La identificación se basa en que cuando los coliformes totales, que presentan la enzima β -D-galactosidasa, metabolizan el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) de Colilert-18, la muestra toma una coloración amarilla por la presencia de ortonitrofenol. Cuando *E. coli*, que presenta la enzima β -glucuronidasa, metaboliza el sustrato MUG (4-metilenbeliferin- β -D-glucurónido) la muestra fluoresce.

Cuando se incuba a 44,5 °C Colilert-18 detecta coliformes termotolerantes. El indicador ONPG produce coloración amarilla cuando es metabolizado por los coliformes termotolerantes a dicha temperatura.

- 3.2. Colilert-18 puede detectar estas bacterias a una concentración de 1 NMP/100 mL dentro de las 18 horas, hasta en presencia de 2 millones de bacterias heterotróficas por cada 100 mL.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis debe ser realizado utilizando guantes descartables, lentes y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Los resultados deben ser leídos entre las 18 y 22 horas de incubada la muestra. Los positivos para coliformes totales y para *E. coli* o coliformes termotolerantes observados antes de las 18 horas y los negativos observados después de las 22 horas también son válidos.
- 5.2. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Colilert-18 con un blanco testigo de la misma muestra de agua.

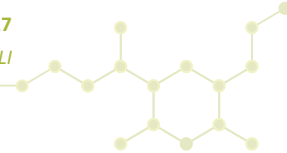
- 5.3. Colilert-18 puede usarse para *E. coli* (pero no para coliformes) en aguas marinas. En este caso las muestras deben diluirse al menos 10 veces.
- 5.4. Colilert-18 es una prueba primaria del agua. Las características de rendimiento de Colilert-18 no se aplican a muestras alteradas por enriquecimiento o concentración previos.
- 5.5. En caso de muestras con exceso de cloro, tal vez se observe un destello azul al añadir Colilert-18. Si se observa, considerar que la muestra no es válida y suspender la prueba.
- 5.6. Las bacterias no coliformes como *Aeromonas*, *Flavobacterias* y *Pseudomonas*, producen pequeñas cantidades de la enzima β -D-galactosidasa, pero generalmente no producen reacción positiva a menos que se encuentren presentes a una concentración mayor a 10^6 ufc/100 mL. A su vez algunas cepas de *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* también producen una respuesta de fluorescencia; debido a que ambas son patógenas, no se considera un detrimento para evaluar la calidad sanitaria del agua.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0$ mg/L), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Bandeja de incubación (Quanti-Tray, IDEXX)
- 7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX)
- 7.3. Probetas de 100 mL estériles
- 7.4. Estufa de incubación a 35 °C $\pm 0,5$ °C (para Coliformes totales y *E. coli*)
- 7.5. Baño de incubación a $44,5$ °C $\pm 0,2$ °C (para Coliformes termotolerantes)
- 7.6. Lámpara UV 365 nm
- 7.7. Recipientes estériles de vidrio con capacidad mínima de al menos 150 mL
- 7.8. Anzas
- 7.9. Autoclave
- 7.10. Mecheros
- 7.11. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca
- 7.12. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a 2-8 °C.
- 7.15. Cámara de flujo laminar (de preferencia)



- 7.16. Cinta de revelado de autoclave
- 7.17. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.18. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.19. Balanza de resolución 0,01 g

8. REACTIVOS

- 8.1. Reactivo Colilert-18 IDEXX
- 8.2. Agua desionizada (grado 2 según norma ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Trabajar entre dos mecheros encendidos para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- 9.2. El material de vidrio que se emplee debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua desionizada estéril

- 11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.4. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra.
- 11.5. Colocar 9,0 mL ± 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio.
- 11.6. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- 11.7. Conservar en heladera (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.8. Añadir el contenido del reactivo Colilert-18 a una muestra de 100 mL de agua (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.
- 11.9. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.
- 11.10. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador Quanti-Tray de IDEXX.
- 11.11. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 35 °C ± 0,5 °C (ó a 44,5 °C ± 0,2 °C para los coliformes termotolerantes) durante 18 -22 horas.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Si la muestra fue incubada a 35 °C:

- 12.1. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación con estos datos entrar en la tabla de doble entrada de Colilert-18 y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de coliformes totales/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente.

12.2. Para determinar el NMP de *E. coli* /100 mL buscar fluorescencia usando una luz de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 10 cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada, igual que para coliformes totales. El valor corresponde al NMP de *E. coli* /100 mL. En caso de haber diluido la muestra, realizar la corrección correspondiente.

Si la muestra fue incubada a 44,5 °C:

12.3. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación con estos datos entrar en la tabla de doble entrada de Colilert-18 y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de coliformes termotolerantes/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente

En resumen, los resultados obtenidos pueden ser:

| | |
|--|---|
| no amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C o 44,5 °C | Negativo para coliformes totales, <i>E. coli</i> y coliformes termotolerantes |
| amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C | Positivo para coliformes totales |
| amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 44,5 °C | Positivo para coliformes termotolerantes |
| amarillo y fluorescente cuando se incubó a 35 °C | Positivo para <i>E. coli</i> |

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Como control de calidad se recomienda inocular 3 recipientes estériles cargados con 100 mL de agua estéril con:

- E. coli*
- coliforme total (*Klebsiella pneumoniae*)
- no coliforme (*Pseudomona aeruginosa*)

A su vez:

Incubar 100 mL de agua desionizada estéril para comprobar esterilidad

Seguir el procedimiento antes mencionado para el análisis de muestras.

Los resultados obtenidos son:

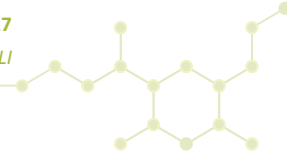
| | |
|---|--|
| no amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C o 44,5 °C | <i>Pseudomona aeruginosa</i> (no coliforme) |
| amarillo y no fluorescente cuando se incubó a 35 °C | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (coliforme total) |
| amarillo y fluorescente cuando se incubó a 35 °C; o amarillo cuando se incubó a 44,5 °C | <i>E. coli</i> |

13.2. Realizar el control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

13.3. **Control de la precisión del método:** Establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07). Al comienzo de programas hacer las muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.4. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.5. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, aceptando como máximo una variación del 5 %.



14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9223 Enzyme substrate coliform test pp. 9-93 a 9-95.
- 14.2. Manual de instrucciones 2011, Colilert®-18 Kit. IDEXX Laboratories, Inc.
- 14.3. IDEXX Colilert-18 and Quanti-Tray method for the detection of fecal coliform in wastewater. October 2011



5058UY

Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales



Técnica de filtración por membrana

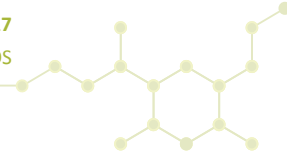
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas.
- 1.2. Los enterococos son cocos gram positivos, anaerobios facultativos, que se presentan en parejas o en cadenas, siendo difícil distinguirlos de los estreptococos solo sobre la base de sus características físicas. Dos de las especies son comensales en el intestino humano: *E. faecalis* y *E. faecium*. También incluye otras especies como *E. gallinarum* y *E. avium*.
- 1.3. Los enterococos se diferencian de otros estreptococos por su habilidad de crecer en cloruro de sodio al 6,5 %, en bilis esculina agar, en BHIB agar a 10 °C y en caldo BHI a 45 °C. Los enterococos son muy resistentes y pueden tolerar una amplia variedad de condiciones ambientales.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista” (5072UY)
- 2.6. Procedimiento “Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.” (5065UY)
- 2.7. Procedimiento “Control de calidad para análisis bacteriológicos.” (PGC 07)
- 2.8. Procedimiento “Limpieza de materiales.” (PR 16)
- 2.9. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02)
- 2.10. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, 86 y 97)
- 2.11. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.12. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.13. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.14. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.15. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.16. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.17. Rutas de análisis (RMB 06)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El grupo de enterococos para la técnica de filtración por membrana se define como todas aquellas bacterias que cuando se incuban en medio mEI por 24 h a 41 °C ± 0,5 °C desarrollan colonias con un halo azul, sin importar el color de las colonias.
- 3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 41 °C.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando túnica y guantes descartables a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

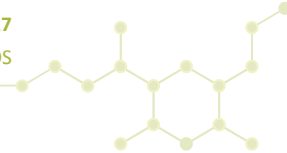
- 5.1. Aguas con gran turbidez; presencia de tóxicos orgánicos como fenoles; existencia de una carga de bacterias muy grande de otros microorganismos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Referirse al **Procedimiento 5065UY**, cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante. Deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34-51 Kpa.
- 7.2. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.3. Incubadora a $41 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10 a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de $60\text{-}80^{\circ}$ con la placa (de preferencia).
- 7.5. Autoclave
- 7.6. Mecheros
- 7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado.
- 7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de $0,45\text{ }\mu\text{m} \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.
- 7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.
- 7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.14. Heladera a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.15. Anzas
- 7.16. Cámara de Flujo Laminar (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Cinta de revelado de autoclave
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)



8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol
- 8.3. Medio de cultivo mE Agar
- 8.4. Agua desionizada (grado 2 según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.5. Acido nalidíxico ($C_{12}H_{12}N_2O$ Nro. CAS 389-08-2)
- 8.6. Triphenyl tetrazolium chloride (TTC $C_{19}H_5ClN_2$ Nro. CAS 298-96-4)
- 8.7. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS. 1310-73-2) 0,1 N
- 8.8. Indoxyl- β -D-glucoside ($C_{14}H_{17}NO_6$ Nro. CAS 487-60-5)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.
- 9.2. Las placas de Petri de plástico deben estar estériles.
- 9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo su utilización.
- 9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas.

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

- 11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación del medio de cultivo mEI.

- 11.4. Agregar 71,2 g del medio deshidratado mE y 0,75 g de indoxyl- β -D glucoside a 1 litro de agua desionizada, y calentar hasta que los ingredientes se disuelvan. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos, y posteriormente enfriar en un baño de agua a 44-46 °C.
- 11.5. Reactivos a agregar luego de la esterilización: mezclar 0,24 g de ácido nalidixico en 5 mL de agua desionizada estéril, agregar unas pocas gotas de NaOH 0,1 N para disolver (aproximadamente 0,2 mL). Filtrar para esterilizar y agregar al medio mEI. Agregar separadamente 0,02 g de triphenyl tetrazolium chloride (TTC) al medio mEI y mezclar.
- 11.6. El pH final del medio debe ser $7,1 \pm 0,2$. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 14 días, ya sea en Erlenmeyer o repartido en las placas. Dejar registro en la ruta de análisis.

Preparación de las Placas de Petri

- 11.7. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.
- 11.8. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.
- 11.9. Almacenar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta su utilización.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.10. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.
- 11.11. Colocar 9 mL ± 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.
- 11.12. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 11.13. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis del de la muestra.

- 11.14. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.
- 11.15. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltras poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.16. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.17. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.18. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadrículada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.
- 11.19. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.20. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.21. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.22. Incubar las placas de Petri en posición invertida dentro de bolsas herméticas, en incubadora a 41 °C ± 0,5 °C durante 24 h ± 2 h.

Recuento

- 11.23. Las colonias de enterococos son aquellas que presentan un halo azul, sin importar el color de las mismas.
- 11.24. El recuento de colonias se realiza en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de enterococos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

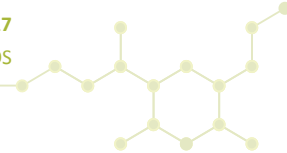
- 12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{Enterococos (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de enterococos contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc: corresponde a Unidades Formadoras de Colonias.

- 12.2. Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana se informa como crecimiento confluyente con o sin presencia de enterococos y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.
- 12.3. Si el número de colonias de enterococos fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.



12.4. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación:

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

12.5. Si el recuento es cero, hay dos casos a considerar:

- Cuando el volumen filtrado es de 100 mL, se informa < 1 ufc/100 mL.
- Cuando el volumen filtrado es menor 100 mL, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de enterococos, y expresar los resultados como < valor obtenido.

12.6. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15 \times 100)}{50} = 30 \text{ enterococos /100 mL}$$

12.7. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo si se examinan 0,1 y 0,03 mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78 + 21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 76.000 \text{ enterococos /100 mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:** Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.

Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).

Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico. Dicho criterio debe ser establecido para los diferentes tipos de aguas que sean analizados por la técnica de membrana filtrante.

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo, hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 2), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

Repetibilidad: Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington DC. Método 9230 C Membrane filter techniques pp. 9-112 a 9-115.

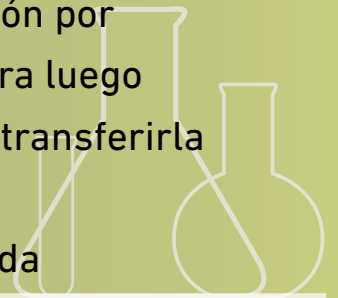
14.2. EPA. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus Indoxyl- β -D-Glucoside Agar (mEI). Diciembre 2009.



5065UY

Modificación de la técnica estándar de filtración por membrana que permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis

Técnica de Filtración por Membrana modificada



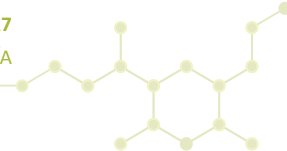
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica consiste en una modificación de la técnica estándar de filtración por membrana y permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis. Este método puede ser usado cuando resulta impráctico aplicar el método convencional, por ejemplo en casos donde el lugar de muestreo es lejano al laboratorio, cuando el tiempo entre el muestreo y el análisis excede el permitido o cuando no es posible mantener la temperatura deseada de la muestra durante el transporte.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Referirse a la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales, 5053UY.
- 2.2. Referirse a la determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales, 5054UY.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de la muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa; el filtro se dispone en el medio de transporte bacteriostático y se transporta hasta el laboratorio. Se completa la determinación en el laboratorio transfiriendo la membrana, al medio de cultivo correspondiente según la determinación que se quiera realizar (coliformes termotolerantes o coliformes totales) y se incuba según las condiciones especificadas en cada procedimiento. Posteriormente se realiza el recuento de colonias típicas desarrolladas en la placa.
- 3.2. El medio de transporte está compuesto por agentes bacteriostáticos y permite mantener a las bacterias viables evitando el crecimiento de otros organismos durante el período de transporte (máximo 72 h).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

8. REACTIVOS

- 8.1. Peptona (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.2. Etanol 95 %
- 8.3. Medio de cultivo específico: M-FC Agar o M-Endo Agar, según corresponda.
- 8.4. Agar (Difco, BBL u Oxoid)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2, según norma ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.6. Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Nro. CAS 10049-21-5)
- 8.7. Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4)
- 8.8. Sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ Nro. CAS 63-74-1)
- 8.9. Tris (hidroximetil) aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ Nro. CAS 77-86-1)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

11.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación del Medio de transporte (M-ST)

11.2. La composición del medio M-ST es la siguiente:

| | |
|---|-------------|
| Fosfato de sodio monobásico, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,1 g |
| Fosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4 | 3,0 g |
| Sulfanilamida | 1,5 g |
| Etol (95 %) | 10 mL |
| Tris (hidroximetil) aminometano | 3,0 g |
| Agar | 15 g |
| Agua desionizada..... | .c.s.p. 1 L |

11.3. Preparar el medio y rehidratarlo en la cantidad especificada de agua.

11.4. Posteriormente esterilizarlo a 121 °C durante 15 minutos. El pH final debe ser $8,6 \pm 0,2$. Dejar registro en el RPR 16.

11.5. Dispensar 4-5 mL del medio en placas de Petri.

11.6. Almacenar en la heladera y usar dentro de las 96 horas.

Preparación del medio de cultivo específico

11.7. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación de las placas de Petri

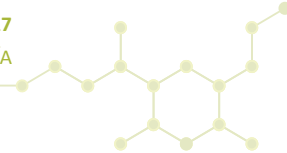
11.8. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Preparación de tubos para diluciones

11.9. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Análisis de la muestra

11.10. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua peptonada estéril. Se recomienda



filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra se recomienda filtrar tres volúmenes

- 11.11. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.
- 11.12. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.
- 11.13. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vortex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.
- 11.14. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril.
- 11.15. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.
- 11.16. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.
- 11.17. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.
- 11.18. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo con el entramado hacia arriba en el medio de transporte (M-ST agar). Mantener refrigerado o a temperatura ambiente por un máximo de 72 horas.
- 11.19. Una vez en el laboratorio, antes de las 72 h del muestreo retirar el filtro del medio de transporte y colocarlo en el medio de incubación específico a la determinación que se quiera realizar, evitando la formación de burbujas de aire, pasando suavemente la pinza por el borde del filtro. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla invertida en la estufa de incubación correspondiente, durante el tiempo correspondiente.

Recuento

Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

14. BIBLIOGRAFÍA

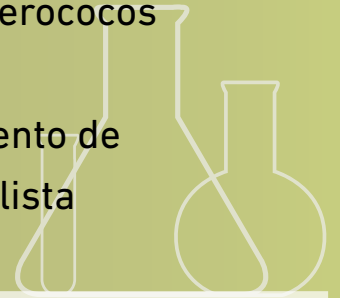
- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9222 E Delayed Incubation Thermotolerant Coliform Procedure y 9222 C Delayed Incubation Total Coliform Procedure, pp. 9-87 a 9-89 y 9-84 a 9-85.



5070UY

Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas



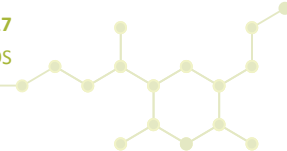
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales” (5058UY)
- 2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.7. Procedimiento Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE13, INE 86 e INE97)
- 2.9. Instructivos de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.10. Instructivos de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.14. Instructivos de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 09)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se definen como enterococos todos los cocos Gram positivos, entre 0,5 a 1,0 μm de diámetro, catalasa negativa, creciendo en medio Bilis Esculina Agar y BHIB con 6,5 % NaCl a 35 °C, y creciendo en Brain Heart Infusión Agar a 10 °C, y en el medio Brain Heart Infusión Broth a 45 °C.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia en cámara de flujo laminar utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora a 35 °C \pm 0,5 °C.
- 7.2. Incubadora a 45 °C \pm 0,5 °C.
- 7.3. Incubadora a 10 °C \pm 0,5 °C.
- 7.4. Mecheros.
- 7.5. Porta y cubre objetos
- 7.6. Ansa de inoculación
- 7.7. Termómetros calibrados para controlar las incubadoras.
- 7.8. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.

- 7.9. Balanzas de resolución 0,01 g
- 7.10. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, estériles.
- 7.11. Autoclave
- 7.12. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
- 7.13. Gradilla para tubo de ensayos.
- 7.14. Heladera a 2-8 °C.
- 7.15. Cámara de flujo laminar.
- 7.16. Bomba dosificadora (de preferencia)
- 7.17. Microondas (de preferencia)
- 7.18. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), con sus respectivos punteros estériles.
- 7.19. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.20. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.21. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1 Medio de cultivo Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
- 8.2 Medio de cultivo Brain Heart Infusion Broth (BHIB)
- 8.3 Medio de cultivo Bilis Esculina Agar (BEA)
- 8.4 Etanol
- 8.5 Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.6 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %.
- 8.7 Tinción de Gram: lugol, alcohol cetona, fucsina de Zichl.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

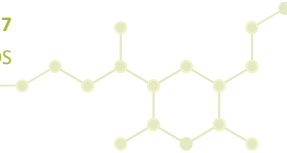
Operaciones previas

Preparación del medio BHIA (agar BHI)

- 11.1. Preparar el medio BHIA como lo indica el envase.
- 11.2. Disolver en microondas, y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- 11.3. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.
- 11.4. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Preparación del medio BHIB (caldo BHI)

- 11.5. Preparar el medio BHIB como lo indica el envase.
- 11.6. Disolver en microondas, y repartir aproximadamente 3-4 mL en tubos de ensayo de vidrio. Rotular los mismos.
- 11.7. Tapar los tubos con tapa de algodón, colocar en gradilla autoclavable, tapar con papel aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos
- 11.8. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.



Preparación del medio BHIB con 6,5 % de NaCl

11.9. Agregar 60 g NaCl a la formulación de BHIB preparada en el punto anterior.

Preparación del medio Bilis Esculina Agar (BEA)

11.10. Preparar el medio BEA como lo indica el envase.

11.11. Disolver en microondas, y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

11.12. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.

11.13. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Procedimiento de verificación

11.14. Repicar colonias típicas crecidas en el filtro de nitrocelulosa a placas de Petri con Brain Heart Infusion Agar (BHIA) para obtener colonias aisladas, e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 a 48 horas.

11.15. Transferir una ansada de una colonia aislada en Brain Heart Infusion Agar a tubos con Brain Heart Infusion Broth (BHIB) e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.

11.16. De la misma colonia preparar un frotis para coloración de Gram y en otro porta objetos esparcir parte de la colonia que se está analizando para realizarle la prueba de catalasa. Dicha prueba consiste en colocar una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre el preparado y observar el desarrollo de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno. Si se observan burbujas se lee como catalasa positivo, e indica que la colonia no pertenece al género enterococos. Si la prueba es catalasa negativa, realizar la tinción de Gram. Los enterococos son gram positivos.

11.17. Posteriormente transferir una ansada del tubo con Brain Heart Infusion Broth a cada uno de los siguientes medios:

- una placa con Bilis Esculina Agar e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB e incubar a 45 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB con 6,5 % NaCl e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- una placa con agar BHI e incubar a 10 °C ± 0,5 °C por 48 horas.

11.18. Se consideran como colonias verificadas de pertenecer al género enterococos aquellas que son gram positivas, catalasa negativa, y con crecimiento en Bilis Esculina Agar y BHIB con 6,5 % NaCl a 35 °C, así como crecimiento en agar BHI a 10 °C, y en caldo BHI a 45 °C.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

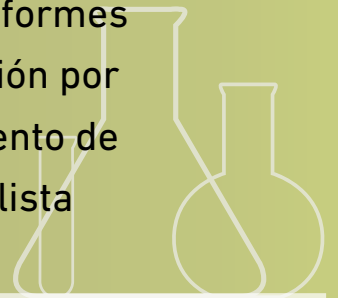
14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9230 C Membrane filter techniques pp. 9-112 a 9-115.



5071UY

Control de calidad analítico para verificar coliformes totales determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas



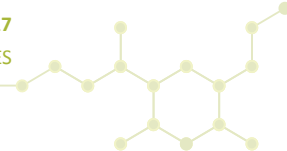
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar coliformes totales, determinados por la técnica de filtración por membrana, para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento “Determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales” (5054UY)
- 2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.7. Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97)
- 2.9. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.10. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.11. Instructivo de equipo analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.12. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.13. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.14. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 07)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Para la verificación de las colonias de coliformes totales se emplean pruebas bioquímicas convencionales o test bioquímicos rápidos como lo son el ONPG (ortonitrofenil galactósido) y CO (citocromo oxidasa).
- 3.2. Cuando se emplean pruebas bioquímicas rápidas, el fundamento es el siguiente: el ONPG es una molécula estructural similar a la lactosa pero la glucosa ha sido sustituida por el ortonitrofenilo. Para que la lactosa pueda ser hidrolizada se requieren 2 enzimas: permeasa y β -galactosidasa. La acción de la β -galactosidasa hace que el ONPG se hidrolice en galactosa y ortonitrofenol de color amarillo, el cual indica una reacción positiva. En microorganismos fermentadores lentos de lactosa, ésta entra en la célula lentamente por permeabilidad debido a una deficiencia de permeasa, pero no en β -galactosidasa la cual produce la ruptura de la lactosa en glucosa y galactosa.
- 3.3. En lo que respecta a la prueba enzimática de citocromo oxidasa, esta enzima es necesaria para la oxidación del citocromo-C. Este citocromo sufre reducción, ocurriendo la oxidación del colorante a púrpura. Los coliformes no poseen citocromo-C dando resultado negativo.
- 3.4. Las colonias de coliformes totales verificadas son aquellas colonias de coliformes totales que presenta el siguiente perfil enzimático: citocromo-oxidasa negativa y β -galactosidasa positivas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia en cámara de flujo laminar, utilizando guantes descartables y túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La prueba no puede usarse en bacterias con pigmentación amarilla a menos que primero se centrifugue la suspensión antes de interpretar los resultados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C
- 7.2. Mecheros.
- 7.3. Ansas de inoculación.
- 7.4. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
- 7.5. Balanzas de resolución 0,01.
- 7.6. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, esterilizadas.
- 7.7. Autoclave.
- 7.8. Tubos de vidrios pequeños (tipo viales) con tapa de algodón estériles.
- 7.9. Gradilla para tubo de vidrio pequeños o viales.
- 7.10. Heladera a 2-8 °C.
- 7.11. Cámara de flujo laminar.
- 7.12. Pipeta automática de 1000 µL con sus respectivos punteros estériles.
- 7.13. Pinzas.
- 7.14. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.15. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.16. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

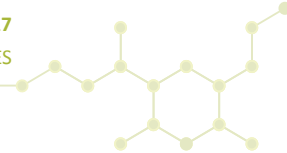
- 8.1. Discos para el test bioquímico de citocromo oxidasa (CO) (BBL, DIFCO u OXOID)
- 8.2. Discos para el test bioquímico de β- galactosidasa (ONPG) (BBL, DIFCO u OXOID)
- 8.3. Medio de cultivo no selectivo TSA (Tryptic Soy Agar) o Agar Nutritivo (BBL, DIFCO u OXOID)
- 8.4. Medio de cultivo no selectivo TSB (Tryptic Soy Agar) (BBL, DIFCO u OXOID)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.
- 9.2. No pueden ser utilizadas ansas de metal para la prueba de CO dado que el metal reacciona con el reactivo de dicha prueba enzimática dando resultados falsos positivos, por lo que se recomienda usar ansas descartables estériles o descontaminadas (lavado y posterior tratamiento con hipoclorito y luego con etanol 70 % durante 30 minutos) o en su defecto emplear punteros de pipetas esterilizados previamente en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 9.3. Las colonias de coliformes totales deben ser aisladas en TSA u otro agar nutritivo antes de realizar la verificación. Esto se debe a que al ser las mismas de color rojo, darían resultados falsos positivos, ya que el indicador vira a rojo indicando reacción positiva.
- 9.4. Al picar la colonia para colocar una ansada en el disco de CO, tener cuidado de no arrastrar medio de cultivo junto con la colonia ya que dificulta la lectura del test.
- 9.5. Las colonias a verificar deben pertenecer a un cultivo joven (18 – 48 h). El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.



11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Obtención de colonias aisladas y puras en TSA

- 11.1. Preparar el medio TSA como lo indica el envase.
- 11.2. Disolver agitando
- 11.3. Luego de disuelto, autoclavar 15 minutos a 121 °C.
- 11.4. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente, y repartirlo en las placas de Petri. Dejar registro de la preparación en el RPR 16.
- 11.5. Antes de utilizar las placas, dejarlas secar en estufa a 35 °C por 24 horas preferentemente.
- 11.6. En cámara de flujo realizar aislamientos por estrías de colonias típicas y no típicas.
- 11.7. Incubar las placas invertidas en estufa a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.
- 11.8. Las placas con las colonias aisladas y puras pueden ser selladas con Parafilm y guardadas en heladera a 2-8 °C por 24 horas antes de realizar las pruebas bioquímicas.

Procedimiento de verificación

Test de CO:

- 11.9. Si se cuenta con los discos comerciales se puede proceder de diferentes maneras:
 - Colocar en una placa de Petri estéril, un disco de CO. Humedecer con agua destilada estéril. Con un ansa descartable o puntero de pipeta estéril, tomar una ansada de la colonia a verificar, y tocar con el inóculo el disco. Esperar 5 min y leer la reacción por viraje del indicador a color púrpura indicando reacción positiva.
 - Otra manera es suspender la colonia en un tubo con 0,5 mL de agua destilada estéril y luego colocar el disco. Esperar 5 min para leer la reacción. Será un resultado positivo aquella colonia que desarrolle un color rojo intenso sobre el disco.

Test ONPG:

- 11.10. Colocar 0,5 mL de TSB (caldo de soja trypticase) al 1 % en un tubo de ensayo pequeño o vial, esterilizar.
- 11.11. Suspender una ansada de cultivo en dicho vial, utilizando una pinza (es necesario inocular en forma cargada). Colocar el disco comercial de ONPG en el vial e incubar 4-6 h a 35 °C ± 0,5 °C. Son positivas aquellas colonias que desarrollan color amarillo. Continuar incubando los tubos que presenten una reacción negativa por un total de 24 h antes de desecharlos como negativos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.
- 12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

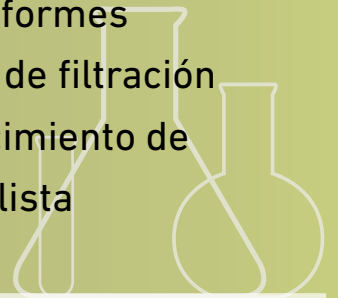
- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 9222 B Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure pp. 9-78 a 9-83
- 14.2. Prospecto BBL Taxo Discs para detectar microorganismos fermentadores de lactosa.
- 14.3. Prospecto BBL para identificación de *Neisseria* y *Pseudomona*.



5072UY

Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas



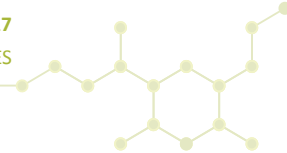
Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes, determinados por la técnica de filtración por membrana, para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales” (5053UY)
- 2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.7. Procedimiento Limpieza de materiales (PR 16)
- 2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE13, INE 86 e INE97)
- 2.9. Instructivos de uso balanza plato abierto (INE 16)
- 2.10. Instructivos de uso cámara de flujo laminar (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98)
- 2.14. Instructivos de uso agitador vórtex (INE 44)
- 2.15. Ruta de análisis (RMB 08)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La verificación de coliformes termotolerantes se basa en la capacidad de los mismos de fermentar la lactosa presente en el caldo lauril triptosa; a su vez la sal biliar presente en el medio de cultivo EC, inhibe el desarrollo de bacterias formadoras de endosporas y bacterias gram positivas.
- 3.2. Se definen como coliformes termotolerantes los bacilos gram negativos, aerobios o anaeróbios facultativos, no formadores de esporas, capaces de fermentar la lactosa con formación de ácido y gas (hidrógeno y dióxido de carbono) cuando se incuban a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.
- 3.3. En este grupo se incluyen los siguientes géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Las colonias de coliformes termotolerantes verificadas son aquellas colonias que evidencian crecimiento y formación de gas cuando se incuban en caldo lauril triptosa y medio EC.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia, en cámara de flujo laminar utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Incubadora a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- 7.2. Baño de agua o Incubadora a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$.
- 7.3. Mecheros.

- 7.4. Campanas de Durham de borosilicato de 7mm x 45 mm aproximadamente.
- 7.5. Ansas de inoculación.
- 7.6. Termómetros calibrados para controlar incubadoras.
- 7.7. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
- 7.8. Balanzas de resolución 0,01 g.
- 7.9. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, esterilizadas.
- 7.10. Autoclave.
- 7.11. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
- 7.12. Gradilla para tubo de ensayos.
- 7.13. Heladera a 2-8 °C.
- 7.14. Cámara de flujo laminar.
- 7.15. Microondas (de preferencia).
- 7.16. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10mL), con sus respectivos punteros estériles.
- 7.17. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.18. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.19. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1. Medio TSA (Tryptic Soy Agar) (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.2. Caldo Lauril Triptosa (CLT) (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.3. Medio EC (marca BBL, Difco u Oxoid)
- 8.4. Etanol (CH₃CH₂OH Nro. CAS 64-17-5)
- 8.5. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y ser estéril.
- 9.2. Las colonias de coliformes termotolerantes pueden ser aisladas en TSA u otro agar nutritivo antes de realizar la verificación con el objetivo de obtener mayor inóculo para realizar las verificaciones. Este paso no es imprescindible de que sea realizado, aunque se aconseja para asegurar que la verificación sea realizada a partir de una colonia aislada, con buen crecimiento y que tenga entre 18-48 h de crecimiento.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

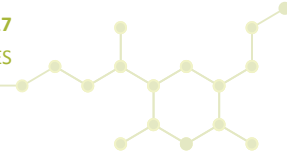
- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas.

Obtención de colonias aisladas y puras en TSA

- 11.1. Preparar el medio TSA como lo indica el envase.
- 11.2. Disolver agitando
- 11.3. Luego de disuelto, autoclavar 15 minutos a 121 °C.
- 11.4. Una vez estéril, termostatarlo a 45 °C aproximadamente, y repartirlo en las placas de Petri. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.5. Antes de utilizar las placas, dejarlas secar en estufa a 35 °C por 24 horas preferentemente.
- 11.6. En cámara de flujo realizar aislamientos por estrías de colonias típicas y no típicas.
- 11.7. Incubar las placas invertidas en estufa a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.
- 11.8. Las placas con las colonias aisladas y puras pueden ser selladas con Parafilm y guardadas en heladera a 2-8 °C por 24 horas antes de realizar las pruebas bioquímicas.



Preparación de los medios de cultivo

- 11.9. Preparar los medios de cultivo CLT y EC como lo indica el envase.
- 11.10. Una vez disueltos, repartir aproximadamente 3-4 mL en tubos de ensayo con campana Durham invertida.
- 11.11. Tapar los tubos con tapa de algodón, colocar en gradilla autoclavable, tapar con papel aluminio o de embalaje y rotular.
- 11.12. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C.
- 11.13. Dejar registro en el RPR 16.
- 11.14. Conservar en heladera a 2-8 °C por un máximo de 14 días.
- 11.15. Dentro de lo posible, si el medio fue conservado en heladera, incubar toda la noche a temperatura ambiente antes de usar. Descartar aquellos tubos que presenten crecimiento y/o burbujas de aire.

Análisis de la muestra.

- 11.16. Una vez obtenidas las colonias aisladas en TSA, con un ansa de inoculación debidamente flameada y enfriada, transferir cada colonia aislada a ser verificada, a un tubo de ensayo con el medio CLT.
- 11.17. Luego de la transferencia, incubar todos los tubos inoculados a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ durante $24 \pm 2\text{ h}$. Aquellos tubos que no evidencian crecimiento o producción de gas en 24 horas (dudosos), se recomienda que sean incubados durante 24 h más para asegurar la lectura correcta de los mismos.
- 11.18. Partiendo de las mismas colonias crecidas en TSA que se inocularon en CLT, se realiza el mismo procedimiento, pero esta vez sembrando tubos con medio EC e incubarlos a $44,5 \pm 0,2\text{ °C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.
- 11.19. Luego de la incubación, realizar la lectura de los tubos, siendo positivos aquellos que evidencian crecimiento y producción de gas en ambos medios de cultivo (CLT y EC).

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.
- 12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. No aplica.

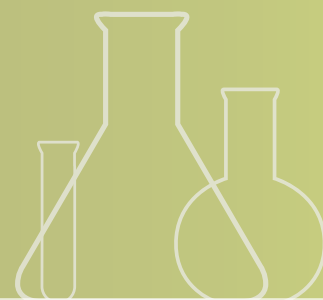
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC. Método 9020 B Interlaboratory Quality Control Guidelines pp. 9-4 a 9-24



5077UY

Recuento de coliformes fecales en muestras de residuos sólidos industriales



Técnica de número más probable

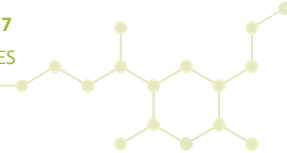
Elaborado - M. Capandeguy

Modificado - No aplica

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para detectar y cuantificar coliformes fecales en residuos sólidos industriales, utilizando el método estadístico de número más probable. El límite de cuantificación es de 0,18 microorganismos/mL o gramo (peso húmedo).

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento 1050UY: Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos). Método termogravimétrico.
- 2.5. Ruta de análisis (RMB 11)
- 2.6. Instructivo de uso autoclaves (INE 13 y 97)
- 2.7. Instructivo de uso incubadora 35 °C (INE 46)
- 2.8. Instructivo de uso baño de agua a 44,5 °C (INE 87)
- 2.9. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 16C)
- 2.10. Instructivo de uso cámara de flujo (INE 17)
- 2.11. Instructivo de uso destilador Barnstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso desionizador Thermo Scientific (INE 28)
- 2.13. Instructivo de uso analizador de pH (INE 98)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. La muestra se diluye o suspende en buffer de dilución y se ajusta el pH, preparándose luego diluciones con las que se inoculan al menos 3 series de 5 tubos cada una de Caldo Lauril Triptosa (CLT). Este medio es utilizado como medio presuntivo, seguido por el medio EC para la confirmación de coliformes fecales. El medio EC no debe ser utilizado para aislar directamente ya que es necesario el enriquecimiento previo en un medio presuntivo (CLT) para la óptima recuperación de coliformes fecales.
- 3.2. El grupo de bacterias de coliformes fecales para la técnica de número más probable se definen como aquellas bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas que crecen y producen gas en CLT luego de ser incubadas a 35 °C ± 0,5 °C por 48 h ± 3 h y posteriormente fermentan lactosa y producen gas tras ser incubadas a 44,5 °C ± 0,2 °C por 24 h ± 2 h en caldo EC. La ausencia de producción de gas indica que no hay coliformes fecales presentes.
- 3.3. La densidad de coliformes fecales es reportada como NMP/g de peso seco.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar lentes, túnica y guantes de descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La distribución desigual de bacterias en la muestra puede resultar en la tergiversación de la densidad real bacteriana dado que la técnica de número más probable se basa en la distribución de Poisson.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN

- 6.1. La muestra debe ser colectada en recipientes estériles de vidrio, plástico o bolsas de nylon. La muestra típica debe ser de al menos 100 g.
- 6.2. Mantener las muestras bacteriológicas por debajo de los 10 °C durante el traslado al laboratorio. El tiempo entre la toma de muestra y su análisis no puede superar las 24 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Recipientes de plástico de 150 mL esterilizables
- 7.2. Tubos de ensayo de vidrio de 14,5 cm x 2,5 cm esterilizables
- 7.3. Tubos de ensayo de vidrio de 14,5 cm x 1,5 cm esterilizables
- 7.4. Campanas de Durham de 6 mm x 50 mm esterilizables
- 7.5. Gradilla para tubos de ensayo
- 7.6. Algodón
- 7.7. Anzas de 3 - 4 mm de diámetro
- 7.8. Mechero
- 7.9. Material de vidrio para la preparación de los medios de cultivo (500 mL y 1000 mL)
- 7.10. Incubadora a $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 7.11. Baño de agua o incubadora a $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$
- 7.12. Placas de Petri de vidrio estériles de 7 cm de diámetro aprox.
- 7.13. Matraces de 1 y 2 L de capacidad
- 7.14. Balanza con resolución 0,01 g
- 7.15. Bolsas de nylon estériles
- 7.16. Analizador de pH
- 7.17. Heladera
- 7.18. Autoclave
- 7.19. Probetas 100 mL de plástico o vidrio
- 7.20. Pipeta automática de 0,1 – 1,0 mL y 1,0 – 10,0 con tips estériles correspondientes
- 7.21. Rastrillos estériles
- 7.22. Campana de flujo laminar (de preferencia)
- 7.23. Estufa de secado

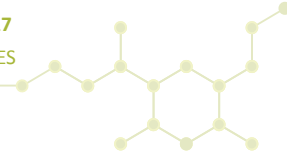
8. REACTIVOS

- 8.1. Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0)
- 8.2. Cloruro de Magnesio (MgCl_2 Nro. CAS 7786-30-3)
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.4. Agar de soja triptica (TSA)
- 8.5. Hidróxido de Sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1,0 N para ajuste de pH
- 8.6. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 1,0 N para ajuste de pH
- 8.7. Medio de cultivo caldo de lauril triptosa (CLT)
- 8.8. Medio de cultivo caldo EC
- 8.9. Cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC # 25922 (de preferencia) como control positivo de los medios CLT y EC
- 8.10. Cepa certificada de *Pseudomonas* sp. ATCC # 27853 (de preferencia) como control negativo del medio CLT
- 8.11. Cepa certificada de *Enterobacter aerogenes* ATCC # 13048 (de preferencia) como control negativo del medio EC

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Utilizar lentes, guantes y túnica para el tratamiento de las muestras.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

- 11.1. **Solución stock de buffer:** Disolver 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N. Llevar el volumen a 1 L con agua desionizada. Esterilizar por filtración o en autoclave por 30 min a 121 °C. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación, la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.2. **Solución stock de cloruro de magnesio:** Agregar 38 g de MgCl_2 a 1 L de agua desionizada. Esterilizar en autoclave por 30 min a 121 °C. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación, la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.3. **Buffer:** Mezclar 1,25 mL de la solución stock de buffer con 5 mL de la solución stock de cloruro de magnesio por litro de agua desionizada. El pH final debe ser de $7,0 \pm 0,2$; de lo contrario ajustar con NaOH o NaCl 1N. Rotular el recipiente indicando nombre del reactivo, fecha de elaboración y técnico responsable. Almacenar en heladera hasta el momento de uso, si hay evidencia de moho o de cualquier otro tipo contaminación la solución debe de ser descartada y se debe preparar una nueva.
- 11.4. **TSA:** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro de medio a preparar utilizar 40,0g de TSA. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de $7,3 \pm 0,2$ ajustar con soluciones de NaOH o NaCl. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Dispensar en placas de Petri estériles, aproximadamente 20 mL por placa. Dejar que el medio alcance temperatura ambiente antes de almacenar o usar. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Almacenar invertidas por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.5. **Caldo lauril triptosa (CLT):** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro a preparar utilizar 35,6 g de CLT y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de $6,8 \pm 0,2$ ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 5,0 mL en tubos de ensayos y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.6. **Caldo lauril triptosa 2X (CLT 2X):** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada litro a preparar utilizar 71,2 g de CLT y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de $6,8 \pm 0,2$ ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 10,0 mL en tubos de ensayo y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.7. **EC:** Preparar de acuerdo a instrucciones del fabricante. Por cada a litro a preparar, colocar 37,0 g de EC y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de $6,9 \pm 0,2$, ajustar con soluciones de NaOH o NaCl 1N. Dispensar 5,0 mL en tubos de ensayo y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo, fecha de elaboración y nombre del operador. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera.
- 11.8. **Preparación de recipientes con buffer para diluciones:** Colocar 90 mL de buffer en recipientes de plástico de 150 mL. La cantidad de recipientes con buffer a preparar depende de la cantidad de series de diluciones que se vayan a realizar. También colocar 270 mL de buffer en frascos de 500 mL (preparar tantos como muestras a analizar). Tapar, rotular, cubrir con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Almacenar en heladera hasta el momento de su uso, máximo 30 días.
- 11.9. **Control positivo:** Mantener un cultivo stock de E. coli en medio TSA para el control positivo de los medios CLT y EC, renovándolo cada 30-40 días aproximadamente.
- 11.10. **Control negativo:** Mantener un cultivo stock de Enterobacter aerogenes en TSA para control negativo del medio EC y cultivo stock de Pseudomonas sp en TSA para control negativo del medio CLT, renovándolo cada 30-40 días aproximadamente.

Preparación de la muestra

11.11. **Muestras sólidas:** Pesar 30,0 g \pm 0,1 g de la muestra previamente mezclada en una bolsa estéril. Agregar 270 mL de buffer estéril y agitar enérgicamente hasta lograr una mezcla homogénea. Esta es la muestra "homogeneizada" (concentración = 0,1 g/mL). Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Si el valor de pH está muy alejado de este rango, utilizar HCl o NaOH más concentrado, de forma de no exceder el volumen de la muestra homogeneizada por más de 5 % (15 mL).

Nota 2: No dejar la muestra homogeneizada a temperatura ambiente por más de 30 minutos.

Diluciones de la muestra: Usar una pipeta estéril para transferir 10 mL de la muestra homogeneizada a 90 mL de buffer. Agitar manualmente un mínimo de 25 veces. Esta es la dilución 1 (concentración = 0,01 g/mL). A partir de esta, realizar diluciones seriadas transfiriendo 10 mL de la dilución anterior a 90 mL de buffer (dilución 2, 3, ...).

11.12. **Caso especial de muestras líquidas (% peso seco \leq 7 %):** Colocar 300 mL de la muestra en una bolsa estéril y agitar manualmente para homogeneizar. Ajustar el pH a 7,0 -7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada". Si el valor de pH está muy alejado de este rango, utilizar HCl o NaOH más concentrado, de forma de no exceder el volumen de la muestra homogeneizada por más de 5 % (15 mL).

Para las diluciones de la muestra el procedimiento a seguir es el mismo que se realiza para muestras sólidas (11.11)

Análisis de la muestra

Fase presuntiva con caldo lauril triptosa (CLT)

11.13. Preparar CLT y colocarlo en tubos como se menciona en la Sección 11.5 Si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente.

11.14. Sembrar los tubos. Para cada muestra se utilizan por lo menos 4 series, denominadas A, B, C y D con 5 tubos cada una. Cuando se siembran 10 mL de muestra, se deben utilizar tubos con concentración 2X (al doble). Rotular claramente cada tubo para identificar la muestra y la dilución inoculada.

Serie A. Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie A con 10,0 mL de muestra homogeneizada. Esta serie de tubos contiene 1,0 g de la muestra original. Esta serie de tubos debe contener una concentración del medio de 2X (al doble de concentración).

Serie B. Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie B con 1,0 mL de la muestra homogeneizada. Esta serie de tubos contiene 0,1 g de la muestra original.

Serie C. Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie C con 1,0 mL de la dilución de "1". Esta serie de tubos contiene 0,01 g de la muestra original.

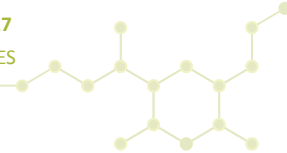
Serie D. Usar una pipeta estéril para inocular cada uno de los 5 tubos de la serie D con 1,0 mL de la dilución de "2". Esta serie de tubos contiene 0,001 g de la muestra original.

Nota 3: Las diluciones descritas anteriormente se indican a modo de ejemplo. Si se conoce de antemano que la concentración de coliformes fecales es mayor a 1600 NMP/mL, entonces co-menzar sembrando 1,0 mL de la muestra homogeneizada y las 3 siguientes consecutivas. Realizar las series que mejor se adecuen según la concentración de coliformes fecales esperada.

11.15. Incubar los tubos sembrados a 35 °C \pm 0,5 °C. Luego de 24 h \pm 2 h examinar los tubos para ver crecimiento y producción de gas. Si no hubo producción de gas, re-incubar por otras 24 h \pm 2 h.

11.16. Los tubos en los cuales se evidenció crecimiento y producción de gas dentro de las 48 h \pm 3 h, se consideran presuntivamente positivos. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa, ya que puede deberse a un mal manejo de la campana.

11.17. Para los tubos con reacción presuntiva positiva pasar a la fase de confirmación con EC.



Fase confirmativa para coliformes fecales usando el medio de cultivo EC

- 11.18. Preparar los tubos de EC según sección 11.7. Por cada tubo positivo de CLT, se inocula un tubo de EC. Si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente.
- 11.19. Agitar suavemente el tubo que presentó reacción positiva presuntiva.
- 11.20. Usar un anza estéril para transferir crecimiento desde el tubo de reacción presuntiva positiva al correspondiente tubo de EC.
- 11.21. Colocar todos los tubos inoculados de EC en un baño de agua o incubadora a $44,5 \pm 0,2$ °C (dentro de la media hora post inoculación) y dejarlos por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.
- 11.22. Luego de la incubación, examinar cada tubo en busca de crecimiento y producción de gas. El crecimiento y la producción de gas en caldo EC luego de $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ son considerados como reacción de coliformes fecales positiva. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa.
- 11.23. Registrar los resultados positivos y negativos de EC

Determinación de % peso seco

- 11.24. Pesar entre 10 - 30 g de la muestra en un crisol o plato.
- 11.25. Dejar secar durante toda la noche a una temperatura entre $103 - 105$ °C. Permitir que la muestra llegue a temperatura ambiente dentro del desecador antes de pesarla.
- 11.26. Calcular el % de peso seco de la siguiente manera:

$$\% \text{ peso seco} = \frac{\text{g muestra seca}}{\text{g muestra húmeda}} \times 100$$

Nota 4: en el caso de contar con balanza de humedad, ver procedimiento 1050UY: Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos). Método termogravimétrico.

12. ANÁLISIS DE DATOS

La densidad de coliformes fecales se calcula siguiendo la técnica de número más probable (NMP). Debido a la extrema variabilidad de la muestras, el resultado se expresa en NMP/g en peso seco. A este resultado se llega siguiendo los próximos 3 pasos: selección de las diluciones significativas, cálculo NMP/g, cálculo de NMP/g peso seco.

Selección de diluciones significativas

De las 4 series realizadas en 11.3, solamente 3 de ellas son consideradas como significativas. Leer todos los siguientes pasos para la elección.

- 12.1. Elegir la serie menos concentrada con resultados positivos en los 5 tubos. Esta serie y las 2 siguientes menos concentradas son consideradas como las significativas. (Tabla 2, ejemplo A).
- 12.2. Si la serie más concentrada tiene menos de 5 tubos positivos se selecciona esa serie y las dos que les siguen. (Tabla 2, ejemplos B y C).
- 12.3. Si al aplicar los pasos 1 y 2, queda sin seleccionar una serie menos concentrada con algún tubo positivo, entonces seleccionar la serie más concentrada que presente menos de 5 tubos positivos y las siguientes 2 series. (Tabla 2, ejemplo D).
- 12.4. Si al aplicar las reglas anteriores queda aún sin seleccionar una serie menos concentrada con resultados positivos, entonces agregar el número de tubos positivos de esta serie a los de la serie más diluida de las que fueron seccionadas. (Tabla 2, ejemplo E).
- 12.5. Si al aplicar las reglas anteriores, las series realizadas no son suficientes como para seleccionar 3, seleccionar las 3 series menos concentradas. (Tabla 2, ejemplo F).

Cálculo de NMP/g de peso húmedo

12.6. Obtener el índice de NMP de la Tabla 1, considerando las diluciones significativas seleccionadas en el paso anterior. Los límites de confianza del 95% también pueden ser obtenidos de la Tabla 1.

$$\text{NMP/g} = \frac{\text{índice de NMP (Tabla 1)}}{\text{g de muestra de la dilución más concentrada (de las 3 seleccionadas como significativas)}}$$

Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie.

| Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | | Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | |
|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior | | | Inferior | Superior |
| 0-0-2 | 0,36 | 0,03 | 1,01 | 1-3-2 | 1,25 | 0,29 | 2,96 |
| 0-0-3 | 0,54 | 0,03 | 1,37 | 1-3-3 | 1,47 | 0,38 | 3,64 |
| 0-0-4 | 0,72 | 0,08 | 1,74 | 1-3-4 | 1,69 | 0,48 | 4,60 |
| 0-0-5 | 0,91 | 0,15 | 2,12 | 1-3-5 | 1,91 | 0,57 | 5,66 |
| 0-1-0 | 0,18 | 0,03 | 0,63 | 1-4-0 | 1,05 | 0,21 | 2,45 |
| 0-1-1 | 0,36 | 0,03 | 1,01 | 1-4-1 | 1,27 | 0,30 | 3,00 |
| 0-1-2 | 0,55 | 0,03 | 1,38 | 1-4-2 | 1,48 | 0,39 | 3,70 |
| 0-1-3 | 0,73 | 0,08 | 1,75 | 1-4-3 | 1,70 | 0,48 | 4,68 |
| 0-1-4 | 0,91 | 0,15 | 2,14 | 1-4-4 | 1,93 | 0,58 | 5,75 |
| 0-1-5 | 1,10 | 0,23 | 2,56 | 1-4-5 | 2,15 | 0,67 | 6,57 |
| 0-2-0 | 0,37 | 0,03 | 1,02 | 1-5-0 | 1,28 | 0,30 | 3,03 |
| 0-2-1 | 0,55 | 0,03 | 1,39 | 1-5-1 | 1,50 | 0,40 | 3,75 |
| 0-2-2 | 0,74 | 0,08 | 1,76 | 1-5-2 | 1,72 | 0,49 | 4,77 |
| 0-2-3 | 0,92 | 0,15 | 2,15 | 1-5-3 | 1,95 | 0,58 | 5,83 |
| 0-2-4 | 1,11 | 0,23 | 2,58 | 1-5-4 | 2,17 | 0,68 | 6,64 |
| 0-2-5 | 1,29 | 0,31 | 3,07 | 1-5-5 | 2,40 | 0,77 | 7,31 |
| 0-3-0 | 0,56 | 0,03 | 1,40 | 2-0-0 | 0,45 | 0,03 | 1,19 |
| 0-3-1 | 0,74 | 0,09 | 1,77 | 2-0-1 | 0,68 | 0,06 | 1,64 |
| 0-3-2 | 0,93 | 0,16 | 2,17 | 2-0-2 | 0,91 | 0,15 | 2,13 |
| 0-3-3 | 1,12 | 0,23 | 2,60 | 2-0-3 | 1,15 | 0,25 | 2,69 |
| 0-3-4 | 1,30 | 0,31 | 3,10 | 2-0-4 | 1,39 | 0,35 | 3,38 |
| 0-3-5 | 1,49 | 0,39 | 3,72 | 2-0-5 | 1,64 | 0,46 | 4,37 |
| 0-4-0 | 0,75 | 0,09 | 1,79 | 2-1-0 | 0,68 | 0,06 | 1,66 |
| 0-4-1 | 0,94 | 0,16 | 2,19 | 2-1-1 | 0,92 | 0,15 | 2,16 |
| 0-4-2 | 1,12 | 0,24 | 2,63 | 2-1-2 | 1,16 | 0,25 | 2,72 |
| 0-4-3 | 1,31 | 0,32 | 3,13 | 2-1-3 | 1,41 | 0,36 | 3,43 |
| 0-4-4 | 1,50 | 0,40 | 3,77 | 2-1-4 | 1,66 | 0,46 | 4,47 |
| 0-4-5 | 1,69 | 0,48 | 4,62 | 2-1-5 | 1,92 | 0,57 | 5,71 |
| 0-5-0 | 0,94 | 0,16 | 2,21 | 2-2-0 | 0,93 | 0,16 | 2,18 |
| 0-5-1 | 1,13 | 0,24 | 2,65 | 2-2-1 | 1,18 | 0,26 | 2,76 |
| 0-5-2 | 1,33 | 0,32 | 3,17 | 2-2-2 | 1,43 | 0,36 | 3,49 |
| 0-5-3 | 1,52 | 0,40 | 3,82 | 2-2-3 | 1,68 | 0,47 | 4,56 |
| 0-5-4 | 1,71 | 0,48 | 4,70 | 2-2-4 | 1,94 | 0,58 | 5,81 |
| 0-5-5 | 1,90 | 0,56 | 5,63 | 2-2-5 | 2,21 | 0,69 | 6,75 |

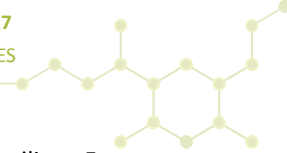


Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie (Continuación).

| Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | | Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | |
|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior | | | Inferior | Superior |
| 1-0-0 | 0,20 | 0,03 | 0,68 | 2-3-0 | 1,19 | 0,26 | 2,79 |
| 1-0-1 | 0,40 | 0,03 | 1,08 | 2-3-1 | 1,44 | 0,37 | 3,55 |
| 1-0-2 | 0,60 | 0,03 | 1,49 | 2-3-2 | 1,70 | 0,48 | 4,67 |
| 1-0-3 | 0,81 | 0,11 | 1,91 | 2-3-3 | 1,97 | 0,59 | 5,91 |
| 1-0-4 | 1,01 | 0,19 | 2,36 | 2-3-4 | 2,23 | 0,70 | 6,83 |
| 1-0-5 | 1,22 | 0,28 | 2,87 | 2-3-5 | 2,51 | 0,82 | 7,59 |
| 1-1-0 | 0,40 | 0,03 | 1,09 | 2-4-0 | 1,46 | 0,38 | 3,61 |
| 1-1-1 | 0,61 | 0,03 | 1,50 | 2-4-1 | 1,72 | 0,49 | 4,77 |
| 1-1-2 | 0,81 | 0,11 | 1,92 | 2-4-2 | 1,99 | 0,60 | 6,00 |
| 1-1-3 | 1,02 | 0,19 | 2,38 | 2-4-3 | 2,26 | 0,72 | 6,92 |
| 1-1-4 | 1,23 | 0,29 | 2,90 | 2-4-4 | 2,54 | 0,83 | 7,68 |
| 1-1-5 | 1,44 | 0,37 | 3,54 | 2-4-5 | 2,82 | 0,94 | 8,36 |
| 1-2-0 | 0,61 | 0,03 | 1,51 | 2-5-0 | 1,74 | 0,50 | 4,88 |
| 1-2-1 | 0,82 | 0,12 | 1,94 | 2-5-1 | 2,01 | 0,61 | 6,10 |
| 1-2-2 | 1,03 | 0,20 | 2,40 | 2-5-2 | 2,29 | 0,73 | 7,00 |
| 1-2-3 | 1,24 | 0,29 | 2,93 | 2-5-3 | 2,57 | 0,84 | 7,76 |
| 1-2-4 | 1,46 | 0,38 | 3,59 | 2-5-4 | 2,86 | 0,95 | 8,45 |
| 1-2-5 | 1,67 | 0,47 | 4,51 | 2-5-5 | 3,15 | 1,07 | 9,10 |
| 3-0-0 | 0,79 | 0,10 | 1,88 | 4-3-0 | 2,71 | 0,90 | 8,09 |
| 3-0-1 | 1,06 | 0,21 | 2,46 | 4-3-1 | 3,26 | 1,11 | 9,34 |
| 3-0-2 | 1,35 | 0,33 | 3,23 | 4-3-2 | 3,86 | 1,32 | 10,60 |
| 3-0-3 | 1,65 | 0,46 | 4,40 | 4-3-3 | 4,51 | 1,54 | 11,92 |
| 3-0-4 | 1,96 | 0,59 | 5,89 | 4-3-4 | 5,21 | 1,76 | 13,31 |
| 3-0-5 | 2,29 | 0,73 | 6,99 | 4-3-5 | 5,93 | 1,96 | 14,77 |
| 3-1-0 | 1,07 | 0,22 | 2,50 | 4-4-0 | 3,35 | 1,14 | 9,53 |
| 3-1-1 | 1,37 | 0,34 | 3,29 | 4-4-1 | 3,98 | 1,37 | 10,84 |
| 3-1-2 | 1,67 | 0,47 | 4,52 | 4-4-2 | 4,66 | 1,59 | 12,23 |
| 3-1-3 | 1,99 | 0,60 | 6,01 | 4-4-3 | 5,39 | 1,81 | 13,68 |
| 3-1-4 | 2,32 | 0,74 | 7,10 | 4-4-4 | 6,15 | 2,02 | 15,21 |
| 3-1-5 | 2,67 | 0,88 | 8,00 | 4-4-5 | 6,93 | 2,23 | 16,81 |
| 3-2-0 | 1,38 | 0,35 | 3,35 | 4-5-0 | 4,11 | 1,41 | 11,11 |
| 3-2-1 | 1,70 | 0,48 | 4,64 | 4-5-1 | 4,83 | 1,64 | 12,56 |
| 3-2-2 | 2,02 | 0,62 | 6,13 | 4-5-2 | 5,59 | 1,87 | 14,09 |
| 3-2-3 | 2,36 | 0,76 | 7,20 | 4-5-3 | 6,39 | 2,09 | 15,70 |
| 3-2-4 | 2,71 | 0,90 | 8,10 | 4-5-4 | 7,22 | 2,30 | 17,39 |
| 3-2-5 | 3,08 | 1,04 | 8,94 | 4-5-5 | 8,06 | 2,50 | 19,16 |

Tabla 1. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones positivas cuando se utilizan 5 tubos por serie (Continuación).

| Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | | Combinación de tubos positivos | Índice NMP/mL | Límite confianza del 95% | |
|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|--------------------------------|---------------|--------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior | | | Inferior | Superior |
| 3-3-0 | 1,72 | 0,49 | 4,77 | 5-0-0 | 2,40 | 0,76 | 7,63 |
| 3-3-1 | 2,05 | 0,63 | 6,24 | 5-0-1 | 3,14 | 1,06 | 9,08 |
| 3-3-2 | 2,40 | 0,77 | 7,31 | 5-0-2 | 4,27 | 1,46 | 11,42 |
| 3-3-3 | 2,76 | 0,92 | 8,21 | 5-0-3 | 5,78 | 1,92 | 14,46 |
| 3-3-4 | 3,13 | 1,06 | 9,06 | 5-0-4 | 7,59 | 2,39 | 18,16 |
| 3-3-5 | 3,52 | 1,20 | 9,89 | 5-0-5 | 9,53 | 1,65 | 22,34 |
| 3-4-0 | 2,09 | 0,64 | 6,36 | 5-1-0 | 3,29 | 1,12 | 9,40 |
| 3-4-1 | 2,44 | 0,79 | 7,42 | 5-1-1 | 4,56 | 1,56 | 12,02 |
| 3-4-2 | 2,81 | 0,93 | 8,33 | 5-1-2 | 6,31 | 2,07 | 15,53 |
| 3-4-3 | 3,19 | 1,08 | 9,18 | 5-1-3 | 8,39 | 2,57 | 19,85 |
| 3-4-4 | 3,58 | 1,23 | 10,02 | 5-1-4 | 10,62 | 3,04 | 24,85 |
| 3-4-5 | 3,99 | 1,37 | 10,86 | 5-1-5 | 12,93 | 3,04 | 30,90 |
| 3-5-0 | 2,48 | 0,80 | 7,53 | 5-2-0 | 4,93 | 1,67 | 12,76 |
| 3-5-1 | 2,86 | 0,95 | 8,44 | 5-2-1 | 7,00 | 2,24 | 16,94 |
| 3-5-2 | 3,25 | 1,10 | 9,31 | 5-2-2 | 9,44 | 2,80 | 22,13 |
| 3-5-3 | 3,65 | 1,25 | 10,17 | 5-2-3 | 12,05 | 3,31 | 28,43 |
| 3-5-4 | 4,07 | 1,40 | 11,03 | 5-2-4 | 14,79 | 3,81 | 37,14 |
| 3-5-5 | 4,50 | 1,54 | 11,89 | 5-2-5 | 17,67 | 5,03 | 52,30 |
| 4-0-0 | 1,30 | 0,31 | 3,11 | 5-3-0 | 7,92 | 2,47 | 18,86 |
| 4-0-1 | 1,66 | 0,46 | 4,45 | 5-3-1 | 10,86 | 3,08 | 25,44 |
| 4-0-2 | 2,07 | 0,64 | 6,31 | 5-3-2 | 14,06 | 3,68 | 34,45 |
| 4-0-3 | 2,53 | 0,82 | 7,64 | 5-3-3 | 17,50 | 4,34 | 51,31 |
| 4-0-4 | 3,02 | 1,02 | 8,81 | 5-3-4 | 21,22 | 5,29 | 67,98 |
| 4-0-5 | 3,55 | 1,21 | 9,96 | 5-3-5 | 25,27 | 8,14 | 79,71 |
| 4-1-0 | 1,69 | 0,48 | 4,60 | 5-4-0 | 12,99 | 3,48 | 31,08 |
| 4-1-1 | 2,12 | 0,66 | 6,46 | 5-4-1 | 17,24 | 4,29 | 49,75 |
| 4-1-2 | 2,58 | 0,85 | 7,79 | 5-4-2 | 22,12 | 5,63 | 70,87 |
| 4-1-3 | 3,10 | 1,05 | 8,98 | 5-4-3 | 27,81 | 8,82 | 86,00 |
| 4-1-4 | 3,65 | 1,25 | 10,16 | 5-4-4 | 34,54 | 11,59 | 101,10 |
| 4-1-5 | 4,25 | 1,45 | 11,38 | 5-4-5 | 42,56 | 14,37 | 118,00 |
| 4-2-0 | 2,16 | 0,67 | 6,61 | 5-5-0 | 23,98 | 7,62 | 76,29 |
| 4-2-1 | 2,64 | 0,87 | 7,94 | 5-5-1 | 34,77 | 11,72 | 101,60 |
| 4-2-2 | 3,17 | 1,08 | 9,15 | 5-5-2 | 54,22 | 17,91 | 141,90 |
| 4-2-3 | 3,75 | 1,29 | 10,37 | 5-5-3 | 91,78 | 26,72 | 220,10 |
| 4-2-4 | 4,38 | 1,50 | 11,64 | 5-5-4 | 160,90 | 38,37 | 410,30 |
| 4-2-5 | 5,04 | 1,71 | 12,97 | 5-5-5 | >160,90 | | |

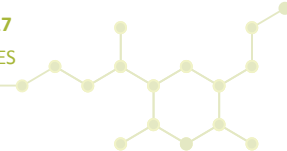


Tabla 2. Ejemplo de selección de series significativas y cálculos de NMP/g

| Ejemplos | 0,001 g | 0,0001 g | 0,00001 g | 0,000001 g | 1er paso Diluciones significativas | 2do paso Índice NMP (Tabla 1) / mayor dilución significativa |
|----------|---------|----------|-----------|------------|------------------------------------|--|
| A | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 0/5 | 5-3-0 | (7,92/0,0001)=79,200 NMP/g |
| B | 4/5 | 5/5 | 1/5 | 0/5 | 4-5-1 | (4,83/0,001)=4830 NMP/g |
| C | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0-1-0 | (0,18/0,001)=180 NMP/g |
| D | 5/5 | 3/5 | 1/5 | 1/5 | 3-1-1 | (1,37/0,0001)=13,700 NMP/g |
| E | 4/5 | 4/5 | 0/5 | 1/5 | 4-4-1 | (3,98/0,001)=3980 NMP/g |
| F | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 2/5 | 5-5-2 | (54,22/0,0001)=542,200 NMP/g |

Cálculo de NMP/g de peso seco

12.7. Para el análisis y el cálculo de % peso seco ir a la Sección 11.3.

12.8. Convertir a NMP/g en peso seco usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{NMP}}{\text{g (peso seco)}} = \frac{\frac{\text{NMP}}{\text{g (peso húmedo)}}}{\% \text{ peso seco (expresado en decimales)}}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Control de cultivos

Cada vez que se analizan muestras se deben realizar los siguientes controles de los medios de cultivo CLT y EC

13.1. **Verificación de esterilidad de los medios de cultivos:** incubar una porción representativa de cada lote de medio de cultivo preparado (1 de cada 50 aprox.) en iguales condiciones que la muestra, a 35 °C ± 0,5 °C (CLT) y 44,5 °C ± 0,2 °C (EC) durante 48 h ± 3 h o 24 h ± 2 h respectivamente, y verificar que no haya crecimiento

13.2. **Controles negativos:** inocular el medio CLT con una especie negativa conocida de coliformes (*Pseudomonas* ATCC # 27853 de preferencia) y el medio EC con una especie negativa de coliformes fecales (*Enterobacter aerogenes* ATCC # 13048 de preferencia) e incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento ni producción de gas.

13.3. **Controles positivos:** inocular los medios CLT y EC con una especie conocida de coliforme fecal (*E. coli* ATCC # 25922 de preferencia) e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe evidenciarse crecimiento y producción de gas.

Blanco

Cada día que se analicen muestras se debe realizar un blanco de muestra.

13.4. **Muestras sólidas:** Esterilizar 100 g de muestra en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Pesar 30,0 g ± 0,1 g de la muestra previamente mezclada en una bolsa estéril. Agregar 270 mL de buffer estéril y agitar para homogenizar. Esta es la muestra "homogeneizada". Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada".

13.5. **Caso especial de muestras líquidas (% peso seco ≤ 7%):** Esterilizar por duplicado 500 mL de muestra en autoclave a 121 °C por 30 minutos. Colocar 300 mL de la muestra en una bolsa estéril y agitar para homogenizar. Ajustar el pH a 7,0-7,5 con soluciones de HCl 1,0 N o con NaOH 1,0 N si es necesario. Esta es la muestra "homogeneizada".

13.6. Preparar la muestra, realizar las diluciones según sección 11.2 sembrar según 11.3 (con 3 series es suficiente) e incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento en ningún tubo.

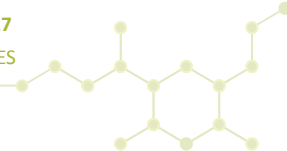
Precisión

Cada día que se analicen muestras, se debe realizar al menos una muestra por duplicado.

- 13.7. Utilizar los valores obtenidos en el cálculo de NMP/g de la muestra realizada por duplicado y calcular sus respectivos logaritmos.
- 13.8. Calcular la diferencia de los logaritmos en valor absoluto.
- 13.9. Verificar que este valor sea menor al valor de precisión del método calculado en la validación de la metodología.

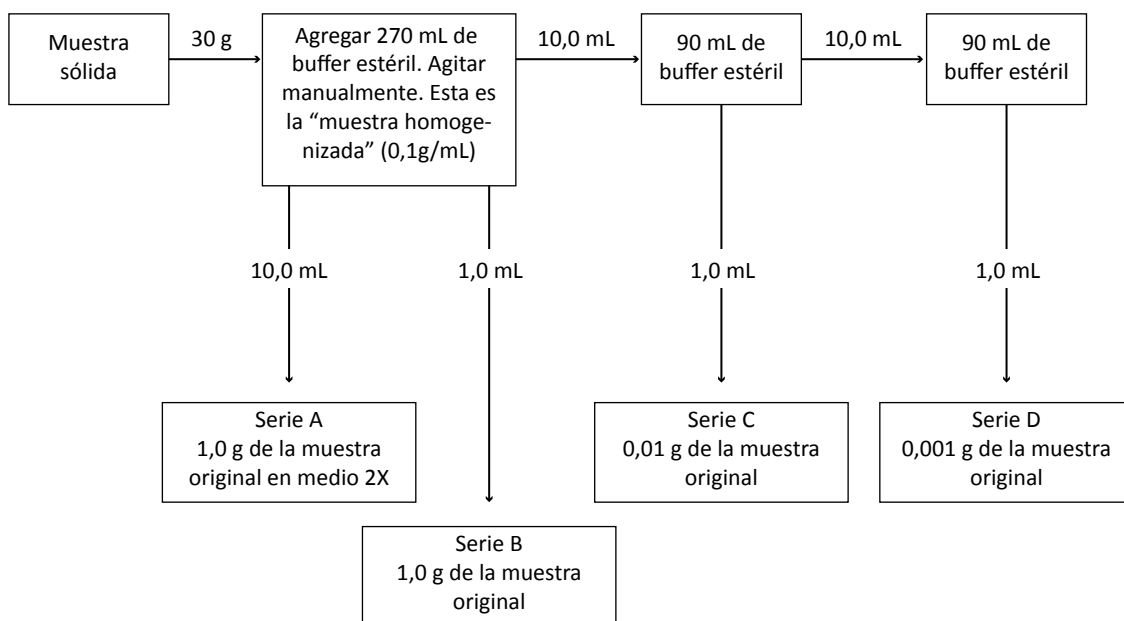
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. EPA-821-R-10-003 Method 1680: Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple tube Fermentation using Lauryl Tryptose Broth (LTB) and EC Medium, US EPA, Abril 2010.

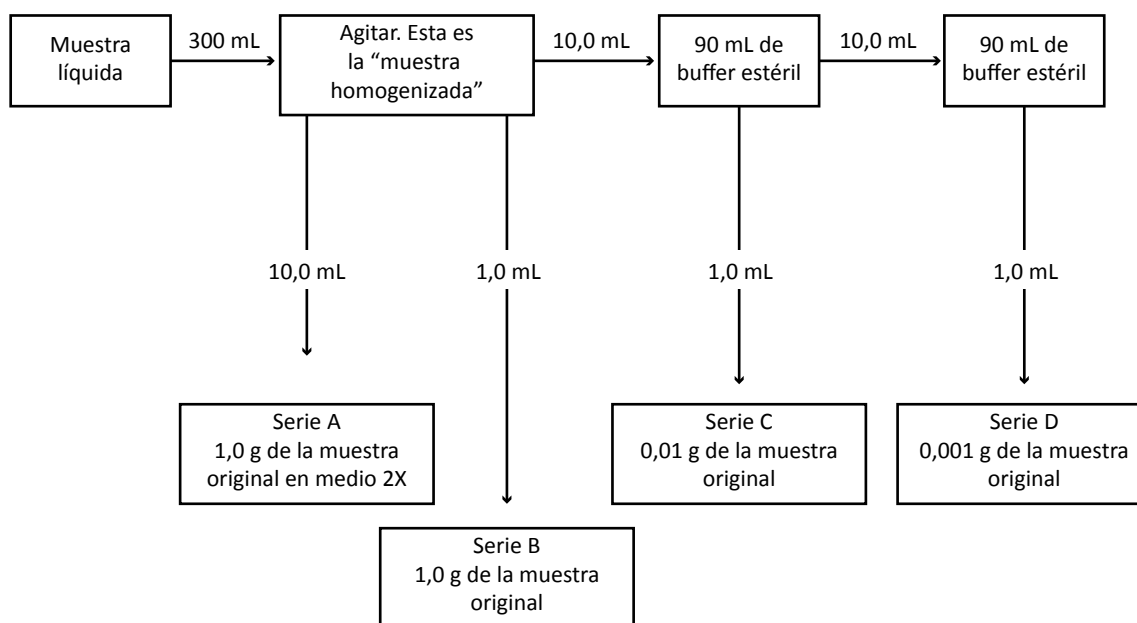


ANEXOS

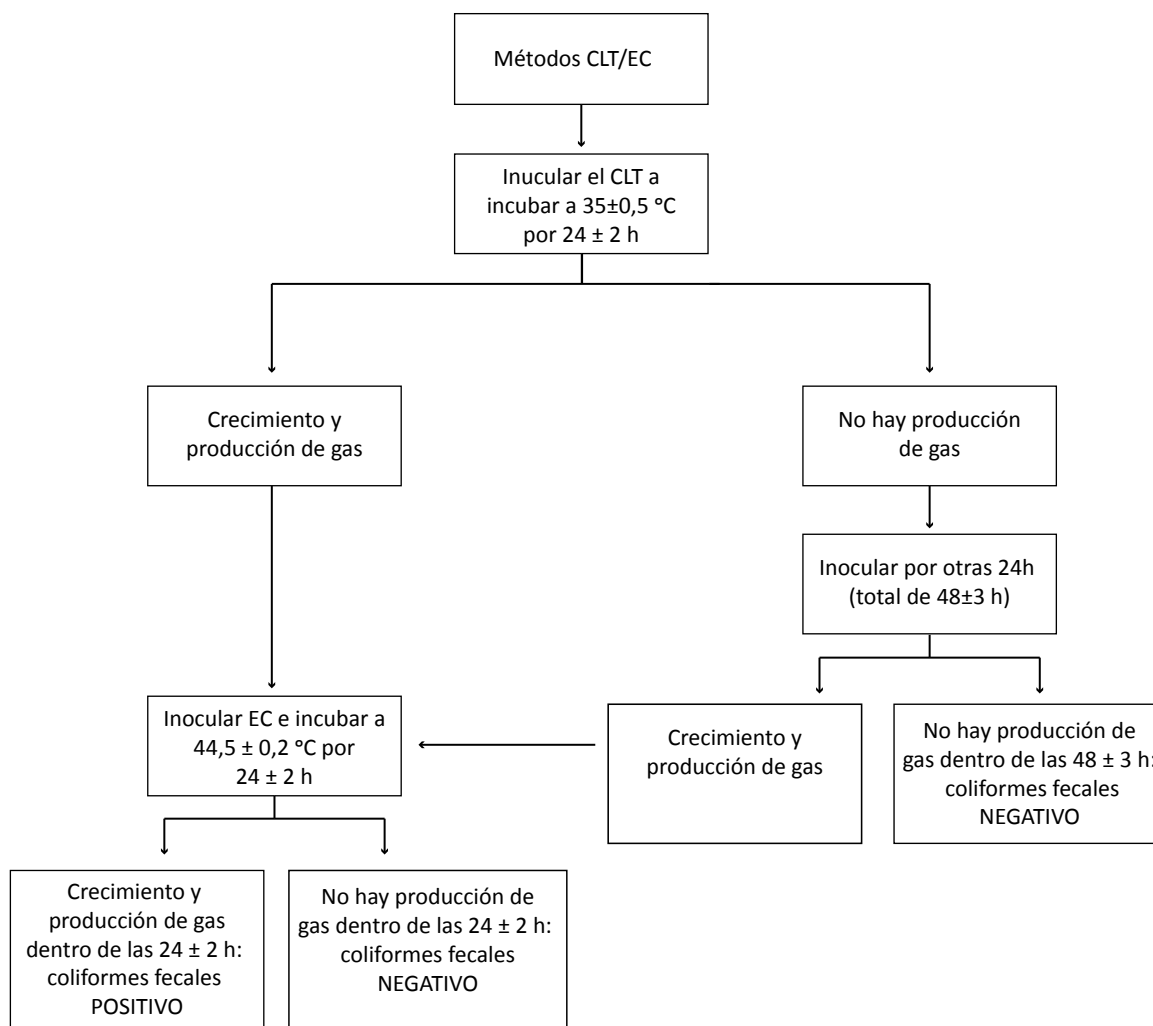
A. Esquema de diluciones y sembrado de tubos para muestras sólidas



B. Caso especial: esquema de diluciones y sembrado de tubos para muestras líquidas (muestra sólida con porcentaje de peso seco menor o igual a 7%)



C. Esquema de fermentaciones



5079UY

Determinación de Enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales



Sustrato definido, Enterolert™

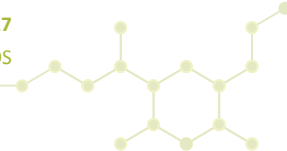
Elaborado - G. Pistone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de Enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, obteniendo resultados en 24 horas.
- 1.2. El grupo enterococos es un subgrupo del grupo de estreptococos fecales, que incluye *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. avium*. Los enterococos se diferencian de otros estreptococos por su habilidad de crecer en cloruro de sodio al 6,5%, en bilis esculina agar, y en BHIB agar a 10 °C y en caldo BHI a 45 °C.
- 1.3. El límite de detección, al igual que el límite de cuantificación, es de 1 NMP/100 mL.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07)
- 2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16)
- 2.7. Instructivo de uso de autoclaves verticales (INE 13, INE 86, INE 97)
- 2.8. Instructivo de uso de balanza (INE 16)
- 2.9. Instructivo de uso de cámara de flujo laminar (INE17)
- 2.10. Instructivo de uso de destilador Barnstead (INE 36)
- 2.11. Instructivo de uso de desionizador Thermo Scientific (INE 82)
- 2.12. Instructivo de uso de agitador vórtex (INE 44)
- 2.13. Instructivo de uso de sellador Quanti-tray (INE 43)
- 2.14. Ruta de análisis (RMB 10)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra de agua un reactivo específico, e incubar la muestra durante 24 horas. Enterolert™ detecta enterococos tales como *E. faecium* y *E. faecalis* en agua dulce y agua de mar. La identificación se basa en que cuando los enterococos utilizan su enzima β -D-glucosidasa para metabolizar el indicador de nutrientes de Enterolert, 4-metil-umbeliferil β -D-glucosido, la muestra fluoresce.
- 3.2. Enterolert™ detecta enterococos en una muestra de agua de 1 NMP/100 mL dentro de 24 horas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El análisis debe ser realizado utilizando guantes descartables, lentes y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Enterolert™ con un blanco testigo de la misma muestra de agua.
- 5.2. La muestra de agua de mar deberá diluirse al menos 10 veces con agua destilada estéril.
- 5.3. Enterolert™ es una prueba primaria del agua. Las características de desempeño de rendimiento de Enterolert™ no se aplican a muestras alteradas por cualquier enriquecimiento o concentración previos.
- 5.4. Algunas especies del género *Serratia*, *Klebsiella*, y *Aerococcus* (no enterococos) que producen la enzima β -D-glucosidasa, no producen respuesta positiva a menos que se encuentren a una concentración mayor a 10^5 ufc/100 mL

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.
- 6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 h.
- 6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.
- 6.5. Cuando la muestra posee metales pesados ($> 1,0\text{ mg/L}$), el frasco de muestreo debe contener EDTA a pH 6,5 como agente quelante 0,3 mL de una solución de EDTA al 15 % (p/p) cada 120 mL de muestra deben agregarse al frasco de muestreo antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

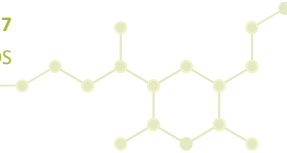
- 7.1. Bandeja de incubación (Quanti-Tray IDEXX).
- 7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX).
- 7.3. Probetas de 100 mL estériles.
- 7.4. Estufa de incubación a $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.5. Lámpara UV 365 nm.
- 7.6. Recipientes estériles de vidrio con capacidad mínima de al menos 150 mL.
- 7.7. Anzas.
- 7.8. Autoclave.
- 7.9. Mecheros.
- 7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.
- 7.11. Pipetas automáticas de 1000 μL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.
- 7.12. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
- 7.13. Heladera a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7.14. Cámara de flujo laminar (de preferencia).
- 7.15. Cinta de revelado de autoclave.
- 7.16. Destilador de agua (Barnstead o similar).
- 7.17. Desionizador de agua (Milli-Q o similar).
- 7.18. Balanza de resolución 0,01 g.

8. REACTIVOS

- 8.1. Reactivo Enterolert™ IDEXX
- 8.2. Agua desionizada (grado 2, según norma ISO 3696 en su versión vigente).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Trabajar entre dos mecheros encendidos para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.
- 9.2. El material de vidrio que se emplee debe estar lavado, enjuagado con agua destilada y esterilizado.



10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua desionizada estéril

- 11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.
- 11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos.
- 11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días.

Preparación de tubos para diluciones

- 11.4. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra.
- 11.5. Colocar 9 mL \pm 0,2 mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio.
- 11.6. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- 11.7. Conservar en heladera (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

- 11.8. Añadir el contenido del reactivo Enterolert™ a una muestra de 100 mL de agua (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.
- 11.9. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.
- 11.10. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador de Quanti-Tray de IDEXX.
- 11.11. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 41 °C \pm 0,5 °C durante 24 horas.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Para determinar el NMP de enterococos /100 mL buscar fluorescencia usando una luz ultra violeta de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 13 cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada. Este valor corresponde al NMP (número más probable) de enterococos /100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Inocular 2 recipientes estériles con 100 mL de agua estéril, con lo siguiente:

- a) *Enterococcus sp.*
- b) Coliforme termotolerante.

Seguir el procedimiento antes mencionado para el análisis de muestras.

Incubar 100 mL de agua estéril para comprobar esterilidad.

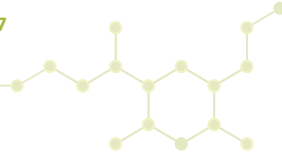
Los resultados obtenidos deben ser:

| | |
|--------------------|--------------------------|
| no fluorescente | agua estéril |
| no fluorescente | coliforme termotolerante |
| fluorescencia azul | Enterococcus |

- 13.2. Realizar el control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control de temperatura de la incubadora).
- 13.3. **Control de la precisión del método:** Establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07). Al comienzo de programas hacer las muestras por duplicado para obtener un nuevo criterio de precisión rápidamente. Una vez que está establecido el criterio de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido.
- 13.4. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.
- 13.5. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC. Método 9230 D Fluorogenic Substrate Enterococcus Test pp. 9-115 a 9-117.
- 14.2. Manual de instrucciones Enterolert™. 2004. IDEXX Laboratories, Inc.





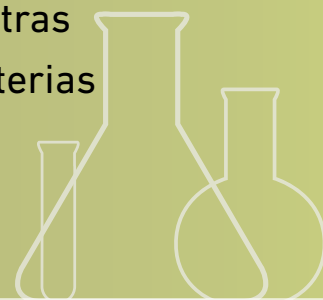
SECCIÓN 6





6159UY

Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales líquidas mediante el test de bacterias luminiscentes (Sistema Microtox®)



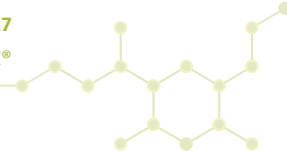
Elaborado - G. Pistone

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para evaluar la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales como son las aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, solución resultante del test de lixiviación de residuos sólidos industriales, mediante el Sistema Microtox®. Este es un bioensayo normalizado, que emplea como organismo indicador una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri*.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Rutas de análisis (RET 03)
- 2.6. Registro de preparación de reactivos (RPR 15)
- 2.7. Instructivos de uso de fotómetro (INE41)
- 2.8. Instructivos de uso de analizador de pH (INE98)
- 2.9. Instructivos de uso de desionizador Thermo Scientific (INE28)
- 2.10. Instructivos de uso de balanza analítica (INE94)
- 2.11. Instructivos de uso de centrífuga (INE 49)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Es un bioensayo estandarizado a nivel internacional, que emplea como organismo a testear una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri*, la cual se encuentra registrada en el NRRL (Agriculture Reseach Service Culture Collection) como B-11177. Para el ensayo se emplea una densidad de bacterias viables de 10^6 cél/mL.
- 3.2. Bajo condiciones adecuadas el microorganismo emplea aproximadamente 10 % de su energía en una vía metabólica que produce luz. Este hecho está intrínsecamente vinculado a la respiración del mismo. Cualquier alteración del ritmo respiratorio, debida a un cambio en el metabolismo o a daños en la estructura celular, causará decrecimiento de la luminiscencia.
- 3.3. La toxicidad aguda se expresa través del parámetro IC_{50} que indica la concentración capaz de inhibir en un 50 % la emisión de luz en un tiempo dado. Se puede medir la inhibición a los 5, 15, o 30 minutos, en cuyos casos el parámetro se denomina IC_{50} (5 min), IC_{50} (15 min), IC_{50} (30 min). IC_{50} (15 min) es el tiempo de análisis usualmente utilizado. Para medir el decrecimiento en la luminiscencia se utiliza un fotómetro Microtox® modelo 500, el cual mide la luz remanente a una longitud de onda de 490 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables, lentes y túnica) de acuerdo a la naturaleza de la muestra bajo estudio.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Aguas con gran **turbidez**, generada por la presencia de sólidos suspendidos, puede reducir la transmisión de luz e incrementar la toxicidad estimada. En este caso centrifugar la muestra a 4000 r/min durante 30 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo recipiente limpio y etiquetado, y realizar el test con dicha fracción de la muestra.
- 5.2. **pH**. Las bacterias son sensibles al pH, pero el efecto es mínimo dentro del rango 6 - 8,5. Tener en cuenta que *Vibrio fischeri* es una especie marina y en los océanos el pH promedio es de 8,1, frecuentemente alcanzando valores de 8,3. Siempre medir el pH de la muestra. Realizar el test sin ajustar el pH de la muestra para determinar el efecto tóxico total. Si el pH de la muestra es menor a 6.0 o mayor a 8.5, es aconsejable determinar también la toxicidad de la muestra sin el efecto del pH, es decir, ajustando el pH dentro del rango

6 - 8 con HCl o NaOH según corresponda, y realizando nuevamente la determinación analítica. En caso de existencia de esta situación, se deberá mencionar en el informe de resultados. En el caso de pH extremos (mayor a 11 o menor a 4), donde la sobrevivencia de las bacterias se encuentra seriamente comprometida, basta realizar un test screening para comprobar la toxicidad de la muestra, y reportar en estos casos como: Muy tóxico.

- 5.3. **Oxígeno disuelto.** No se requiere aireación de la muestra. Bajos niveles de oxígeno en agua no afecta los resultados del test. La manipulación normal de las muestras, y las diluciones al 50 % con soluciones aireadas, se considera suficiente para proveer de oxígeno adecuado para el test, a pesar de la deficiencia de la muestra en oxígeno. A su vez la aireación puede determinar la pérdida de sustancias volátiles de la solución, así como incrementar la tasa de oxidación y degradación de sustancias presentes en la muestra, cambiando de esta forma su toxicidad.
- 5.4. **Color.** Muestras altamente coloreadas (particularmente aquellas en los tonos rojos o marrones), pueden presentar interferencia con la transmisión de la luz, y por ende con la medida de toxicidad. Si la muestra posee color detectado a simple vista, realizar el test básico y determinar la IC_{50} de la misma. De observarse toxicidad en la muestra, comprobar si a esta concentración la muestra tiene color visible. Si se detecta color visible, realizar el protocolo de corrección de color descrito en el Anexo 1.
- 5.5. **Muestras cloradas.** Las bacterias, al igual que la mayoría de los microorganismos, son sensibles al cloro, por lo que de ser necesario, neutralizar el cloro residual con sulfito de sodio. El registro de la existencia original de cloro en la muestra se encuentra establecido en la ficha de ingreso que acompaña a la muestra. Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. En las que persiste, proceder como sigue:
- Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.
 - Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1 + 1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50 (1 mL de ácido en 50 mL de agua desionizada).
 - Adicionar 1,0 mL de solución de KI.
 - Titular con solución de Na_2SO_3 hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución. Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.
 - Registrar el gasto total de solución de Na_2SO_3 .
 - Adicionar la cantidad de Na_2SO_3 necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descripta. El volumen a adicionar de solución de Na_2SO_3 se calcula de la siguiente manera:

$$V_{Na_2SO_3} = \frac{(G_{Na_2SO_3} \times V_{muestra})}{100}$$

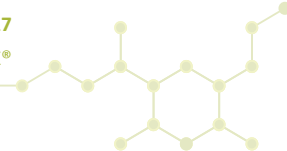
6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Muestras líquidas:

- 6.1.1. La muestra debe ser colectada en frascos de 200-250 mL de vidrio (de preferencia), o de polipropileno. El frasco debe llenarse sin dejar cámara de aire, para mantener los materiales volátiles presentes en la solución. Debe estar debidamente etiquetado, e ingresar al laboratorio acompañado de la ficha de ingreso con los datos que se indican en la misma. Se debe mantener en oscuridad y bajo condiciones de refrigeración.
- 6.1.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.1.3. Es recomendable analizar la muestra lo antes posible. De ser necesario puede conservarse por un período máximo de 72 horas, bajo refrigeración y en oscuridad.

6.2. Lixiviados

- 6.2.1. El lixiviado debe obtenerse a partir de residuos sólidos según el procedimiento 3265UY, y mantenerse en oscuridad y bajo condiciones de refrigeración. El plazo para la realización del lixiviado es de 2 meses. Una vez obtenido la sustancia resultante del test de lixiviación, analizar dentro de las 72 horas.



7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Fotómetro Microtox Modelo 500 (comercializado por Modern Water), con el respectivo software (MicrotoxOmni™ Software for Windows versión 1,15 95/98/NT o equivalente).
- 7.2. Frezzer a -20 °C.
- 7.3. Heladera.
- 7.4. Analizador de pH.
- 7.5. Cubetas cilíndricas de 12 x 50 mm, de vidrio borosilicato, de fondo plano comercializadas por Modern Water.
- 7.6. Micropipetas de 10 µL, y ajustables en el rango 200–1000 µL, con sus correspondientes punteros descartables.
- 7.7. Balanzas de resolución 0,0001 g y 0,001 g.
- 7.8. Timer.
- 7.9. Desionizador de agua (Milli-Q o similar), para obtener agua de calidad desionizada de conductividad menor a 1 µS/cm.
- 7.10. Centrífuga (para trabajar en el rango de 4.000 r/min)
- 7.11. Cubeta de corrección de color (CCC), reusable.
- 7.12. Pipeta Pasteur de vidrio punta fina para protocolo de corrección del color.

8. REACTIVOS

- 8.1. Viales liofilizados de la bacteria *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) comercializada por Modern water, y almacenados a -20 °C (reactivo bacteriano) hasta su fecha de vencimiento.
- 8.2. Solución de reconstitución del reactivo bacteriano (agua ultrapura), comercializada por Modern Water. Puede almacenarse hasta por un año a 2-8 °C.
- 8.3. Cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5) sólido
- 8.4. Diluyente: solución de NaCl 2 % (p/v) en agua desionizada. Agregar 2 g de NaCl a 100 mL de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año a 2-8 °C.
- 8.5. Solución de ajuste osmótico (OAS): solución de NaCl 22 % (p/v) en agua desionizada. Agregar 22 g de NaCl a 100 mL de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año a 2-8 °C.
- 8.6. Tóxicos de referencia: fenol cristalino (C₆H₅OH Nro. CAS 108-95-2) o (opcional) sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O Nro. CAS 74-46-20-0)
Para preparar las soluciones stock (100 mg/L) de los tóxicos de referencia, se pesan 50 mg de la sustancia química y se colocan en un matraz aforado. Enrasar a 500 mL con diluyente (NaCl 2 %). Se mezcla el contenido invirtiendo el recipiente al menos 10 veces. El estándar de fenol puede conservarse en frasco color ámbar y a 2-8 °C durante 4 meses. El estándar de zinc puede almacenarse en iguales condiciones por 3 meses.
- 8.7. Soluciones para ajuste de pH.
 - Solución hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N: disolver 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua desionizada y diluir a 1 L.
 - Solución de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 1 N: diluir 83 mL de HCl comercial (37 %, 12 N) con agua desionizada para obtener 1 L de solución.
- 8.8. Soluciones para muestras cloradas.
 - Solución de sulfito de sodio (Na₂SO₃ Nro. CAS 7757-83-7) 0,025 N: disolver 0,1575 g de Na₂SO₃ en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.
 - Solución de yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0): disolver 10 g de KI en 100 mL de agua desionizada.
 - Solución indicadora de almidón: 5 g de almidón soluble [(8C₆H₁₀O₅)_n Nro. CAS 9005-25-8] en 1 L de agua desionizada. Calentar para disolver. Prepararla en forma diaria.
 - Solución de ácido acético (C₂H₄O₂ Nro. CAS 64-19-7) 1+1, o de ácido sulfúrico (H₂SO₄ Nro. CAS 7667-93-9) 1+50 (1 mL de ácido en 50 mL de agua desionizada).
- 8.9. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

Nota 1: Dejar registro de la preparación de reactivos en el RPR 15.

Nota 2: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No es aconsejable reutilizar las cubetas de vidrio. Trazas de detergentes u otros contaminantes pueden interferir con el resultado del test.
- 9.2. Se aconseja realizar el test dentro de las 2 horas después de haber reconstituido el vial de bacterias. Dentro de este tiempo el organismo responde de forma consistente a un amplio espectro de tóxicos. Pasado dicho tiempo, la respuesta de las bacterias puede verse modificada. Si se utiliza el reactivo luego de las 2 horas de su reconstitución, se aconseja chequear la respuesta de las bacterias corriendo un test básico con un estándar de referencia como el fenol. La IC₅₀ debe situarse dentro del rango correspondiente.
- 9.3. Se debe tener especial precaución en el modo de pipetear, ya que esto condiciona los resultados obtenidos. Para ello, asegurarse de homogeneizar bien la muestra antes de realizar la toma y luego dispensar totalmente el volumen adquirido.

10. CALIBRACIÓN DE LA MUESTRA

- 10.1. No aplica.

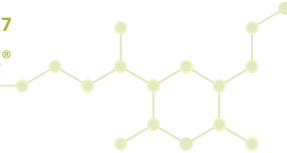
11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Análisis de la muestra

- 11.1. Encender el aire acondicionado de la sala donde se encuentra el equipo Microtox para mantener temperatura ambiente cercana a 20 °C (el rango aceptable es: 15-30 °C).
- 11.2. Conectar el fotómetro a una fuente de corriente. El display muestra una luz roja que luego de estabilizada la temperatura (aproximadamente en 15 minutos) se apaga y prende una luz verde. En ese momento el equipo está listo para usar.
- 11.3. Se enciende el PC y se ingresa al software MicrotoxOmni, indicando el nombre de usuario y el password ("MANAGER"). Se elige la opción "Run a test" y el protocolo de ensayo deseado (por ejemplo "Basic Test"). Allí se completan los siguientes parámetros según se desee: número de controles, número de replicas de los controles, número de muestras, número de réplicas por muestra, número de diluciones por muestra. El resto de los parámetros quedan establecidos automáticamente. Por ejemplo para el caso del test Básico:
 - Inicial Concentration: 45,5
 - Dilution Factor: 2
 - Concentration Units: %
 - Test Times: 5 y 15
 - Time Units: min
 - Zero Time Reading: Click
 - Reading Method: Click Instrument
- 11.4. La disposición de los pocillos en el fotómetro es la siguiente: cuenta con 5 columnas (denominadas del 1 al 5) y 6 filas (denominadas de la A a la F). Además hay un pocillo a la derecha que es para el reactivo bacteriano y otro debajo que es para realizar la medición.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| O | O | O | O | O | A |
| O | O | O | O | O | B |
| O | O | O | O | O | C |
| O | O | O | O | O | D |
| O | O | O | O | O | E |
| O | O | O | O | O | F |

A continuación se detalla procedimiento para analizar una muestra, empleando el test básico (cabe mencionar que el software despliega una guía de procedimiento para cada test que se quiera llevar a cabo):



- 11.5. Colocar cubetas limpias en los pocillos desde A1 a B5. Colocar una cubeta en el pocillo para reactivo bacteriano (termostatizado a $5,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) con 1000 μL de la solución de reconstitución.
- 11.6. Colocar 500 μL de diluyente en las cubetas B1 a B5. Colocar 1000 μL de diluyente en las cubetas A1 a A4.
- 11.7. Colocar 2500 μL de la muestra en la cubeta A5 y agregar 250 μL de OAS. Mezclar aspirando y descargando con la pipeta. Descartar 750 μL .
- 11.8. Preparar diluciones seriadas 1:2 de la muestra haciendo transferencias de 1000 μL desde A5 a A4, desde A4 a A3, y desde A3 a A2. Mezclar con pipeta antes de cada transferencia. Descartar 1000 μL de la cubeta A2. De esta forma, las concentraciones de la muestra en cada una de las cubetas de la fila A es la siguiente: A5 (100 %), A4 (50 %), A3 (25 %) y A2 (12,5 %). En la cubeta A1 solo encontramos el diluyente.
- 11.9. Esperar 5 minutos para que todas las soluciones alcancen los $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 11.10. Reconstituir un vial de reactivo bacteriano: tomar un vial del freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la menor manipulación posible de manera de evitar el calentamiento de las bacterias liofilizadas. Quitar el tapón con una pinza y verter rápidamente en él los 1000 μL de la solución reconstituyente pre-enfriada, para suspender las bacterias. Tapar el vial y agitarlo suavemente 3 o 4 veces de manera de homogeneizar la suspensión. Inmediatamente transferir la suspensión a la cubeta de reconstituyente. Si la adición es lenta, puede ocurrir la lisis de la bacteria. Mezclar con pipeta de 500 μL aspirando y expulsando muy lentamente sin generar burbujas no menos de 20 veces para asegurar una dispersión uniforme del reactivo.
- 11.11. Inmediatamente, transferir 10 μL de reactivo a las cubetas B1 a B5, apoyando el puntero de la pipeta sobre la pared interna de la cubeta, y sin tocar la solución. Agitar suavemente las cubetas para asegurar que el reactivo entre en contacto con la solución.
- 11.12. Esperar 15 minutos para lograr el desarrollo de luminiscencia y que la producción de luz llegue a un estado estable.
- 11.13. Transcurrido ese tiempo, se realizan las lecturas a tiempo cero: colocar la cubeta B1 en el pocillo de lectura, presionar el botón SET del fotómetro para setear el instrumento, y luego proceder con las lecturas del resto de las cubetas según lo va indicando el programa, presionando cada vez el botón READ en el instrumento. Con esto se obtienen las medidas de luminosidad a tiempo cero (I_0).
- 11.14. Inmediatamente transferir 500 μL de solución desde A1 a B1, A2 a B2, A3 a B3, A4 a B4, y A5 a B5. De esta forma, la concentración de la muestra en cada una de las cubetas de la fila B es: B5 (45,50 %), B4 (22,75 %), B3 (11,38 %), B2 (5,68 %), y B1 conteniendo solamente diluyente.
- 11.15. Cuando el monitor lo indique, realizar las lecturas para tiempo 5 minutos y 15 minutos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Los datos de luminiscencia obtenidos son utilizados por el software para calcular el punto final del bioensayo: la concentración de la muestra que causa 50 % de inhibición de la luz emitida por la bacteria *Vibrio fischeri* (IC_{50}). Se mide la IC_{50} para 5 y 15 min (en los casos que se desee se puede continuar la lectura a 30 min, modificando dicho parámetro antes de comenzar el test). En general la IC_{50} se determina para 15 minutos: IC_{50} (15 min). También indica el rango de confianza al 95 % para dicho valor. Cuanto más estrecho sea el rango de confianza, más precisos son los resultados.
- 12.2. La información desplegada en el monitor incluye: las concentraciones analizadas, las lecturas a tiempo 0 (I_0) y tiempo t (I_t), o sea 5 y 15 min, y el cálculo del parámetro "Gamma" para cada concentración y tiempo de exposición, que es el cociente entre la luz perdida y la luz remanente luego que se expuso el reactivo a la muestra. Gamma es calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Gamma} = \frac{(R5 \times I_0) - I_t}{I_t}$$

donde, R5 es la razón del blanco (luz emitida en la cubeta del blanco a tiempo t con respecto a la luz emitida a tiempo cero), que corrige por la pérdida natural de luz que se produce con el paso del tiempo en la cubeta del blanco (conteniendo solamente diluyente y reactivo).

$$R5 = \frac{\text{Control } I_t}{\text{Control } I_0}$$

También se muestra el porcentaje de efecto (o porcentaje de pérdida de luz) de cada concentración de la muestra, comparado con el blanco.

- 12.3. El valor de IC_{50} y el intervalo de confianza al 95 % aparece al pie del reporte. Se calcula a partir de la serie de concentraciones testeadas y por definición $IC_{50} = \text{Gamma } 1$ (cuando el valor de Gamma se iguala a la unidad, la luz perdida es igual a la luz remanente, lo que equivale a decir que la mitad de la luz producida por las bacterias se ha perdido por exposición a la muestra).
- 12.4. Se incluye en el reporte otro gráfico además del anteriormente mencionado: “porcentaje de efecto vs. concentración”, señalándose la línea utilizada para el cálculo de IC_{50} .
- 12.5. Expresar los resultados como IC_{50} , 15 min. También se puede convertir el resultado a unidades de toxicidad (UT), siendo $UT = 100/IC_{50}$. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la muestra según la IC_{50} y correspondiente unidad de toxicidad:

| IC50 | UT | CLASIFICACIÓN |
|-----------|-------------|----------------------|
| < 25 % | > 4 | Muy tóxica |
| 25 a 50 % | 2 a 4 | Tóxica |
| 51 a 75 % | 1,33 a 1,99 | Moderadamente tóxica |
| 76 a 99 % | 1,32 a 1,01 | Levemente tóxica |
| ≥ 100 % | ≤1,00 | No Tóxica |

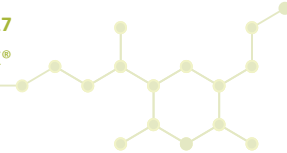
Fuente: Qureshi 1990, p3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de exactitud con el tóxico de referencia:** Como forma de asegurar la validez de los resultados analíticos, cada vez que se reconstituye un vial de reactivo bacteriano, se debe ejecutar el protocolo del Test Básico empleando una solución de 100 mg/L de fenol como tóxico de referencia. La IC_{50} (5 min) de la solución de fenol, debe encontrarse entre 13 y 26 mg/L. Registrar los resultados obtenidos en el gráfico de control correspondiente, donde el valor de 13 mg/L es el límite inferior de control (LIC) y el valor de 26 mg/L es el límite superior de control (LSC).
- 13.2. **Control de la precisión:** Analizar una muestra por duplicado por día de análisis. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control de rangos normalizados correspondiente.
- 13.3. El valor de R^2 (coeficiente de correlación) obtenido de la curva concentración vs. respuesta debe ser mayor o igual a 95 % (0,95).
- 13.4. Cálculo de IC_{50} a partir de datos extrapolados. El valor de IC_{50} se determina por interpolación cuando Gamma vale 1 a partir del gráfico de log (Gamma) vs. log (concentración). Es deseable que cuando la muestra presenta toxicidad, en el test se obtenga al menos una concentración que cause más del 50 % de reducción de luz y otra que cause menos del 50 % de reducción de la luminosidad. De no ser así repetir el test con un rango de concentraciones más adecuadas. Informar el valor de IC_{50} a partir de datos extrapolados, solamente si el rango de confianza al 95 % que aparece al pie del reporte, se sitúa dentro de una misma categoría de clasificación de toxicidad (ver cuadro del punto 11.5). De lo contrario repetir el análisis, e informar el valor solamente si el rango normalizado de los duplicados se encuentra dentro de los límites de control previamente establecidos.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. ENVIRONMENT CANADA. Biological test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (Photobacterium phosphoreum). Report EPS 1/RM/24. November 1992. pp 1-61.
- 14.2. American Public Health Association (APHA) (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WPCF, Washington, DC. Método 8050 Bacterial bioluminescence pp. 8-38 a 8-41.
- 14.3. AZUR ENVIRONMENTAL. MicrotoxOmni™ Software for Windows® 95/98/NT. User Manual. Julio 1999. pp 1-31.
- 14.4. Microtox® M500 Analyser. User manual. Modern Water.
- 14.5. Microtox Manual. A Toxicity Testing Handbook. 1992. Vol IV: Data quality applying results. pp 405-443. Microbics Corporation.



ANEXO 1

Procedimiento para la corrección del color

Luego de obtener el valor de IC₅₀ de una muestra con el test regular, seguir los siguientes pasos.

- A.1. Pipetear 1500 µL del diluyente en cámara externa de la CCC (cubeta de corrección de color) y colocarla a 15 °C ± 0,5 °C.
- A.2. Pipetear 1000 µL del diluyente en una cubeta normal y colocarla en A1.
- A.3. Pipetear 50 µL del reactivo bacteriano reconstituido, en la cubeta A1. Homogeneizar.
- A.4. Utilizando pipeta Pasteur transferir una cantidad suficiente de la suspensión bacteriana reconstituida en la cubeta A1 para la cámara interna de la cubeta CCC, de manera que se obtenga un nivel aprox. igual al del diluyente de la cámara externa, evitando generar burbujas.
- A.5. Luego de 15 min de estabilización, medir la intensidad de luminiscencia en la CCC.
- A.6. Mediante una pipeta Pasteur, remover el diluyente de la cámara externa y transferir allí entre 500 y 1500 µL de la muestra (de la concentración más cercana a la IC50, testeada en el test), previamente termostatzada a 15 °C ± 0,5 °C. Esperar 15 min para lograr el equilibrio y leer nuevamente la luminiscencia.
- A.7. Calcular la absorbancia corregida por color (Ac) para la concentración de la muestra testeada:

$$Ac=3,1 \times \ln(Lo/Lf)$$

donde:

Lo: corresponde al nivel de luz correspondiente a la cubeta CCC con diluyente en la cámara externa

Lf: corresponde al nivel de luz correspondiente a la cubeta CCC con la muestra en la cámara externa

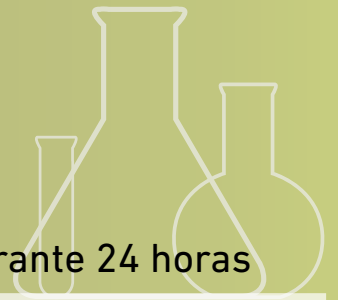
- A.8. En la ventana del programa donde se muestran los resultados del test, colocar la pestaña relativa a corrección de color en posición "Manual". Al hacer esto se agrega automáticamente una nueva columna en la tabla de los resultados que muestra el programa. Típear allí la absorbancia corregida para la concentración que se quiere realizar la corrección por color. Al presionar enter se calcula un nuevo valor de Gamma y porcentaje de efecto, teniendo en cuenta la corrección por color. Este es el valor de IC₅₀ que se debe informar.



6201UY

Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad

Obtención de solución resultante del test de lixiviación (lixiviado) en agua desionizada, durante 24 horas



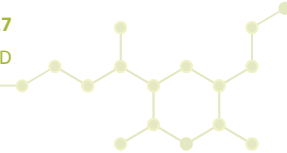
Elaborado - G. Pistone

Modificado - No aplica

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica describe los pasos necesarios que se deben realizar antes de llevar a cabo ensayos de ecotoxicidad en residuos, tanto sólidos como líquidos. Dichos ensayos permiten identificar las propiedades potencialmente peligrosas para el medio ambiente de los residuos, con vistas a su clasificación.
- 1.2. El enfoque de medir la ecotoxicidad a través de ensayos biológicos, resulta particularmente importante en los residuos, ya que los mismos generalmente son una mezcla compleja de composición desconocida. Los bioensayos integran los efectos de todos los contaminantes presentes en la muestra, incluidos los efectos aditivos, sinérgicos y antagonistas. Además son sensibles a la fracción biodisponible de los contaminantes.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental de DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis (RMB 12)
- 2.6. Instructivos de uso de equipos balanza de humedad (INE 113)
- 2.7. Instructivo de uso analizador de pH (INE 98)
- 2.8. Instructivo de uso equipo de agitación (lixiviador, INE 66)
- 2.9. Instructivo de uso centrifuga (INE 49)
- 2.10. Instructivo de uso balanza de resolución 0,1 g (INE06)
- 2.11. Instructivo de uso desionizador (INE 28)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. En aquellos casos que se requiera, se realiza un pretratamiento de la muestra para obtener tamaño de partículas menores a 4 mm. Se pesa una porción de muestra y se mezcla con una cantidad de fluido extractante (agua desionizada) en una relación sólido-líquido igual a 1: 10.
- 3.2. Se coloca en un sistema rotatorio y se hace girar a 5 - 10 r/min durante 24 h \pm 0,5 h, a una temperatura entre 15 °C - 25 °C
- 3.3. El fluido extractante que se obtiene se filtra a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m, para obtener de esta manera el lixiviado.
- 3.4. La caracterización ecotoxicológica posterior se realiza de acuerdo a los procedimientos correspondientes de los distintos ensayos de ecotoxicidad.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. Tener la precaución de que en la mayoría de los casos se va a estar trabajando con material peligroso, por su alta carga potencial de contaminantes tóxicos.
- 4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. En general se aconseja recolectar un mínimo de 1000 g de muestra, pero la cantidad de muestra dependerá del número de ensayos a realizar y de los requisitos de los métodos biológicos que se van a llevar a cabo.
- 6.2. Debido a la alta toxicidad potencial de estas muestras tomar especiales medidas de seguridad en su manejo.
- 6.3. El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse en oscuridad y en refrigeración, en envases herméticos completamente llenos con el residuo para ensayo. En aquellos lodos o residuos activos desde el

punto de vista microbiológico, donde se sospecha que pueda producirse gas, los envases no se deben llenar completamente, dejando un espacio de cabeza que no exceda el 10 % de su capacidad total, por el riesgo de sufrir explosiones.

- 6.4. Los residuos deben almacenarse en bolsas de nylon, envases de polietileno, polipropileno, PTFE o vidrio.
- 6.5. El tiempo de almacenamiento debe ser el menor posible; el tiempo máximo de almacenamiento es de 2 meses, bajo condiciones de refrigeración (la congelación puede inducir cambios en las características de la muestra).
- 6.6. En ningún caso se le deben agregar sustancias para preservar la muestra antes de la extracción.
- 6.7. Los ensayos ecotoxicológicos deben comenzar inmediatamente después de la obtención del lixiviado, y en ningún caso más allá de las 72 h siguientes a su obtención. Si se realiza un ensayo preliminar para determinar el rango de diluciones apropiadas, y posteriormente un ensayo definitivo, este último debe completarse dentro de los 10 días posteriores a la producción del lixiviado.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Equipo de agitación: Debe ser capaz de mantener una agitación permanente durante el periodo de lixiviación ($24 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$), tal que el sólido no se estratifique. Se recomienda un equipo que pueda agitar los recipientes de extracción por inversión entre 5-10 r/min (véase Anexo 1).
- 7.2. Recipientes de extracción: Se necesitan recipientes con suficiente capacidad para contener la muestra y el reactivo de extracción (mínimo 1 litro de capacidad). Pueden ser de vidrio o plástico (polietileno de alta densidad o polipropileno).
- 7.3. Sistema de filtración a vacío (entre 30 y 70 kPa; 300 mbar a 700 mbar) o un aparato de filtración de alta presión ($< 0,5 \text{ mPa}$; 5 bars).
- 7.4. Filtros de nylon o PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.
- 7.5. Medidor de pH.
- 7.6. Balanza de resolución de 0,01 g.
- 7.7. Equipo de tamizado con tamices de 4 mm de tamaño nominal de luz.
- 7.8. Centrífuga que funcione a 2500 g.
- 7.9. Balanza de humedad o en su defecto estufa con control de temperatura para trabajar a $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. No aplica.

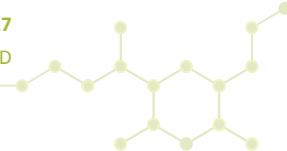
10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Pre-tratamiento de los residuos (trituración y tamizado).

El ensayo de lixiviación debe realizarse sobre materiales que tengan un tamaño de partícula menor a 4 mm en al menos el 95 % (en masa). Si el material que sobrepasa el tamaño deseado es más de un 5 %, la totalidad de esta fracción de mayor tamaño debe triturarse. El material no triturable (por ejemplo partes metálicas como tuercas, pernos, chatarra) deben separarse y registrar peso y naturaleza del material. Independientemente de cualquier reducción de tamaño necesaria, las fracciones separadas, con excepción del material no triturable, deben ser mezcladas para constituir la muestra de ensayo. Si la muestra de laboratorio no se puede triturar o tamizar a causa de su humedad, se permite únicamente en este caso, secar la muestra a una temperatura que no exceda los $40 \text{ }^\circ\text{C}$.



11.2. Determinación de la tasa de contenido de materia seca y humedad

11.2.1 El contenido de humedad debe determinarse a $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, en una porción de muestra independiente.

11.2.1 La tasa de contenido de materia seca (DR) se calcula de la siguiente forma:

$$\text{DR (\%)} = 100 \times (\text{Md}/\text{Mw})$$

donde:

Md: corresponde a la masa de la porción de ensayo seca (kg)

Mw: corresponde a la masa de la porción de ensayo antes del secado (kg)

11.2.2 La tasa de contenido de humedad (MC) se calcula de la siguiente forma:

$$\text{MC (\%)} = \frac{100 \times (\text{Mw}-\text{Md})}{\text{Md}}$$

Nota 1: el contenido de agua se calcula sobre la base de la materia seca (no de la materia bruta, o sea antes del secado)

11.3. Procedimiento de lixiviación

Para residuos monolíticos, residuos granulares, residuos pastosos y lodos:

11.3.1 Se sitúa una porción de ensayo con una masa M correspondiente a $90 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ de masa de materia seca (Md) en un recipiente con un volumen nominal de 1 L, minimizando el espacio de cabeza ($\leq 5 \%$ del total de capacidad del recipiente); también se puede colocar el doble de masa en un recipiente de 2 L, según los recipientes de extracción con los que se cuente, y el volumen de lixiviado requerido para los análisis ecotoxicológicos. Cuando se requiere un gran volumen de lixiviado, es posible realizar el ensayo en un vaso de capacidad adecuada en el que se introducen el número que corresponda de porciones de ensayo, o bien se realiza ensayos de lixiviación en paralelo simultáneos y luego los eluatos individuales se mezclan para obtener la muestra de ensayo.

11.3.2 Se añade una cantidad de lixivante (L) estableciendo una relación Líquido/Sólido (L/S) = 10 Litros/kg $\pm 2 \%$. Se deberá tener cuidado de obtener una buena mezcla entre el sólido y el líquido.

El volumen de lixivante a agregar se calcula de la siguiente manera:

$$L \text{ (litros)} = \frac{(10 - \text{MC}) \times \text{Md}}{100}$$

donde:

L: corresponde al volumen de lixivante usado (en litros)

Md: corresponde a la masa seca de la porción de ensayo (en kg)

MC: corresponde a la tasa de contenido de humedad (en %)

11.3.3 Se sitúa el recipiente tapado en el equipo de agitación (agitador mecánico de inversión 5 a 10 r/min, véase Anexo 1). También se puede utilizar un agitador mecánico de rodillos rotando aproximadamente a 10 r/min. Se agita durante $24 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$ a temperatura ambiente.

11.3.4 Al finalizar el periodo de agitación, se deja que los sólidos en suspensión sedimenten durante $15 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$. Cuando la separación entre las fases sólida y líquida no se logra en este período de tiempo, se centrifuga la muestra a 2500 g (fuerza centrífuga relativa, expresada en g). Si las características de la muestra no permiten separar un volumen de líquido suficiente a través de la centrifugación, podrán utilizarse otros métodos alternativos como el prensado, tamizado, entre otros.

11.3.5 Posteriormente se filtra el fluido extractante preferentemente a través de un filtro de membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro usando un dispositivo de filtración a vacío o presión. Se recomienda el uso de filtros de PTFE (teflón) o de nylon en lugar de filtros de acetato o nitrato de celulosa. Si las condiciones de la muestra no permiten el filtrado, podrán utilizarse alternativamente filtros con tamaño de poro mayor. Al terminar la filtración no lavar el filtro con agua u otro disolvente. Esta filtración permite que las partículas en

suspensión no interfieran en la realización del bioensayo.

11.3.6 Se mide inmediatamente el pH del lixiviado. Los ensayos deben realizarse sin ajuste de pH en la porción de ensayo. Si se observaran efectos tóxicos en las diluciones donde el pH no permite la supervivencia de los organismos, los ensayos pueden repetirse con ajuste de pH de la porción de ensayo. Esta situación deberá reportarse en el informe de resultado.

Para lodos líquidos:

11.3.7 Las partículas grandes se deberían retirar de los lodos por centrifugación durante 30 min a 2500 g y el extracto acuoso se filtra según punto 11.3.5. Con respecto al pH, proceder al igual que en el punto 11.3.6

Residuos líquidos miscibles con agua:

11.3.8 No se necesita un procedimiento específico, el residuo líquido debería usarse para los ensayos de ecotoxicidad acuática después de la filtración (11.3.5), si la misma fuera necesaria. Con respecto al pH, proceder al igual que en el punto 11.3.6.

Residuos líquidos no miscibles con agua:

11.3.9 Se añade una cantidad de lixivante (L) estableciendo una relación líquido/líquido de 10.

11.3.10 Se sitúa el recipiente tapado en un dispositivo de agitación según 11.3.3.

11.3.11 Al finalizar el periodo de agitación, se permite a las dos fases separarse durante 15 min \pm 5 min. Cuando no se alcance la separación de las dos fases líquidas en este período de tiempo, la mezcla se centrifuga a 2500 g.

11.3.12 Posteriormente se filtra el extracto acuoso según 11.3.5. Con respecto al pH, proceder al igual que en el punto 11.3.6.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. No aplica.

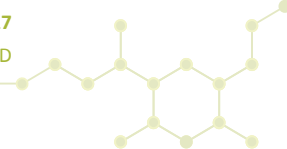
13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Blanco

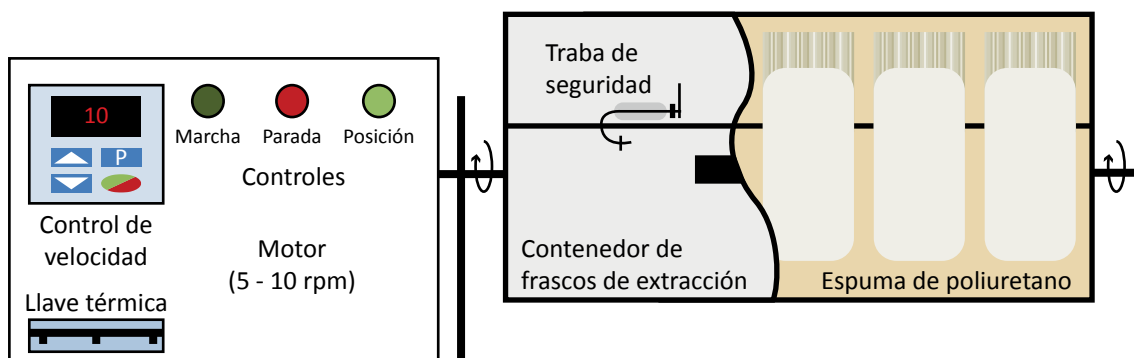
En el análisis de rutina de residuos sólidos industriales se deberá incluir un blanco conteniendo únicamente diluyente. Este blanco será analizado por el método de análisis ecotoxicológico utilizado para las muestras realizadas en paralelo, y en todos los casos la EC_{50} para el blanco debe ser mayor al 100 % (No tóxico).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Norma UNE-EN 14735 "Caracterización de residuos: Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad", Comité técnico AEN/CTN 77 Medio Ambiente, Noviembre 2006.



ANEXO 1 EQUIPO DE AGITACIÓN





SECCIÓN 7

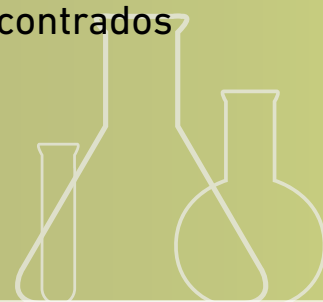




7004UY

Determinación de Clorofila-a y Feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina

Método espectrofotométrico de extracción con acetona



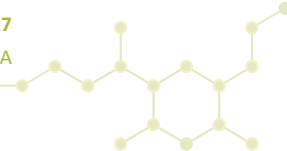
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de clorofila-a y feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina.
- 1.2. La clorofila es el pigmento fotosintético esencial presente en todas las plantas verdes. La determinación de la concentración de clorofila-a provee información acerca de la cantidad (biomasa) y actividad fotosintética potencial de la mayor parte del fitoplancton presente en un cuerpo de agua (algas y cianobacterias), con la excepción de las bacterias fotosintéticas, las cuales carecen de dicho pigmento. El metabolito más importante de la clorofila es la feofitina. La relación entre clorofila y feofitina es indicativa del estado fisiológico de las algas.
- 1.3. El límite de detección es de 0,023 mg/L y el límite de cuantificación de 0,07 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02)
- 2.6. Instructivo de uso de centrífuga (INE 49)
- 2.7. Instructivo de uso de analizador de pH (INE 98)
- 2.8. Instructivo de uso de desionizador Thermo Scientific (INE 28)
- 2.9. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 99)
- 2.10. Ruta de análisis (RMB 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se concentra, por filtración en vacío y a través de un filtro de fibra de vidrio, un volumen de muestra de agua conocido que contiene fitoplancton.
- 3.2. Los pigmentos se extraen del fitoplancton en acetona al 90 % con la ayuda de un mortero mecánico, dejando reposar entre 2 y 24 h.
- 3.3. El extracto se centrifuga a 675 g durante 15 minutos (o 1000 g durante 5 min) para clarificar la solución. Una alícuota del sobrenadante se transfiere a una celda de vidrio y se mide la absorbancia a tres longitudes de onda (664, 665 y 750 nm) para determinar clorofila-a, feofitina-a y turbidez respectivamente.
- 3.4. Se mide la absorbancia de la muestra a 750 y 664 nm antes de acidificar, y a 750 y 665 nm después de la acidificación con HCl 0,1 N.
- 3.5. Para calcular las concentraciones de los pigmentos se insertan los valores en una serie de ecuaciones que utilizan los coeficientes de extinción de los pigmentos puros en acetona al 90 %. Las concentraciones se expresan en mg/L. No es necesaria la calibración del método ni del instrumento con soluciones estándar, cada vez que se realice el procedimiento al utilizar dichas ecuaciones.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Utilizar implementos de seguridad: túnica, guantes, lentes, según la naturaleza de las muestras en estudio.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Cualquier compuesto que absorba luz entre 664 y 665 nm puede interferir en la exactitud de las medidas de absorbancia de la muestra.
- 5.2. Se realiza una medida a 750 nm para determinar la **turbidez**, la cual se resta de las medidas de las otras absorbancias a 664 y 665 nm. Una medida mayor a 0,005 U.A. indica una solución poco clara, lo cual se soluciona centrifugando o filtrando la muestra previo a la lectura.
- 5.3. La cantidad relativa de clorofila a, b y c1+c2 varía con la **composición taxonómica** del fitoplancton y en soluciones que contienen todos los pigmentos es inevitable la sobre o subestimación de los pigmentos debido a la superposición espectral de las clorofilas y la feofitinas.

El valor de feofitina-a queda sobrestimado en presencia de ciertos carotenoides y al acidificar la muestra, cuando la clorofila-b también se convierte en feofitina-b. El grado de conversión de clorofila-b a feofitina-b es más lento que el de clorofila-a. Por lo tanto es importante dejar transcurrir el mínimo tiempo necesario para convertir clorofila-a a feofitina-a, antes de medir la absorbancia a 665 nm, el cual se recomienda que sea de 90 segundos.

- 5.4. Todos los pigmentos fotosintéticos son sensibles a **la luz**. El trabajo se debe realizar con luz tenue y todos los estándares materiales de control de calidad y muestras filtradas se deben almacenar en la oscuridad entre -20 °C y -70 °C para prevenir la rápida degradación.
- 5.5. Las muestras de agua con **pH < 6** deben ser analizadas lo antes posible luego de filtradas, de forma de evitar la posible degradación de la clorofila como consecuencia del agua residual que queda retenida en el filtro.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

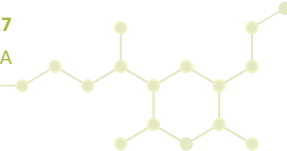
- 6.1. El volumen de muestra a recolectar depende de la densidad del fitoplancton en el agua.
- 6.2. En aguas oceánicas se requieren 4 L, mientras que en lagos y estuarios 1 L es suficiente. Recolectar la muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), color ámbar.
- 6.3. Todos los instrumentos usados para la recolección deben estar limpios y libres de ácido.
- 6.4. Realizar el análisis lo antes posible luego de recolectada la muestra. Si la muestra presenta un pH mayor o igual a 6 y no se va a realizar el análisis inmediatamente, filtrar la muestra dentro de las 24 h y almacenar los filtros cubiertos con papel de aluminio entre - 20 °C y - 70 °C por un máximo de 28 días. Mientras no es filtrada, la muestra debe ser refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C), en oscuridad.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro: visible, múltiple longitud de onda y resolución de 2 nm.
- 7.2. Centrifuga: capacidad de centrifugación a 675 g o a 1000 g.
- 7.3. Mortero mecánico para tejidos: mano de mortero de teflón 50 mm x 20 mm, varilla de acero inoxidable ¼", tubo de vidrio de 30 mL de capacidad.
- 7.4. Filtros de fibra de vidrio: 47 mm, tamaño nominal de poro de 0,7 µm.
- 7.5. Hojas de aluminio.
- 7.6. Timer.
- 7.7. Pinzas con punta chata.
- 7.8. Bomba de vacío: capacidad para filtrar a 6 inHg (20 kPa).
- 7.9. Pipetas automáticas de rango variable 40-100 µL, 100-1000 µL, y 1-10 mL con los tips correspondientes.
- 7.10. Probetas graduadas, capacidad 100 mL y 500 mL .
- 7.11. Celdas de vidrio para espectrofotómetro.
- 7.12. Equipo de filtración, consistente de un matraz de 1 L de polipropileno con un portafiltro de base de 47 mm de diámetro.
- 7.13. Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL de capacidad, con tapa rosca.
- 7.14. Pissetas de polietileno.
- 7.15. Filtro de jeringa no estéril; membrana de nylon, politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno, celulosa regenerada; 25 mm de diámetro; tamaño de poro 0,45 µm.
- 7.16. Heladera a ≤ 6 °C (> 0 °C)
- 7.17. Jeringa de 10 mL.
- 7.18. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1. Acetona UltimAR®, grado espectrofotométrico.
- 8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado. Solución de HCl 0,1 N. Agregar 8,5 mL de HCl concentrado a 500 mL de agua y llevar a 1 L.
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.4. Solución acuosa de acetona (CH₃COCH₃ Nro. CAS 67-64-1): 90 % acetona / 10 % agua desionizada.



8.5. Estándar de clorofila-a from Spinach: C-5753, Sigma. Ampolla de vidrio de color ámbar de 1 mg. Almacenar en oscuridad a -20 °C. (Opcional)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Filtrar a vacío, a través de un filtro de vidrio, al menos 1 L de muestra en un ambiente con luz tenue tomando en cuenta los siguientes requerimientos: el vacío no debe exceder las 6 inHg y el tiempo de filtración debe ser menor a 10 min para evitar la rotura de células y en consecuencia la pérdida de clorofila. Enjuagar el recipiente de la muestra con 20 mL de agua y pasarla por el filtro para asegurarse que se colecten todas las células. En caso de taparse el filtro antes de filtrar 1 L considerar lo filtrado y anotar volumen.

11.2. Retirar el filtro con una pinza y si no se va a realizar la extracción inmediatamente cubrirla con una hoja de aluminio, doblándolo para no colocar la superficie filtrada en contacto con el papel de aluminio. Guardarlo en freezer a -20 °C hasta un máximo de 28 días.

11.3. El filtro con muestra recién obtenida, o el proveniente del freezer, se trata de la siguiente manera: romper con la pinza el filtro en trozos pequeños y empujarlos hasta el fondo del tubo de centrifuga de 50 mL.

11.4. Agregar 4 mL de solución acuosa de acetona al 90 % con una pipeta (el volumen final de la extracción será de 10 mL).

11.5. Moler con mortero mecánico 1 min a 500 r/min.

11.6. Enjuagar el mortero con la solución de extracción (acetona 90 %), completando el tubo hasta llegar a los 10 mL.

11.7. Dejar reposar en la oscuridad y en heladera por un mínimo de 2 h pero no más de 24 h. Agitar 2 o 3 veces durante el período de reposo y tratar a todas las muestras de la corrida igual con respecto al tiempo de reposo.

Antes de continuar con el procedimiento, encender el espectrofotómetro y dejar calentar durante aproximadamente 30 min. Cerar el equipo con acetona al 90 % a todas las longitudes de onda (664 nm, 665 nm y 750 nm). Usar celda de vidrio de 1 cm de paso óptico.

11.8. Centrifugar las muestras durante 15 min a 675 xg o 5 min a 1000 xg.

11.9. Colocar la muestra en un lugar oscuro antes de obtener las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro.

11.10. Cerar el espectrofotómetro con acetona al 90 % a 664 nm, 665 nm y 750 nm.

11.11. Pipetear 3 mL del sobrenadante del extracto en una celda de vidrio del espectrofotómetro.

11.12. Medir la absorbancia a 664 y a 750 nm. Si la medida de absorbancia de la muestra a 750 nm excede las 0,0050 UA, la muestra debe ser filtrada a través de filtro de jeringa y se debe medir nuevamente. Por otro lado, si la señal a la longitud de onda seleccionada es mayor a 0,9000 UA (unidades de absorbancia), diluir y medir nuevamente.

11.13. Acidificar la muestra en la celda del espectrofotómetro con HCl 0,1 N hasta obtener una concentración no mayor a HCl 0,003 N. Por ejemplo, una celda con 3 mL de muestra requiere 90 µL de HCl 0,1 N para obtener una concentración de ácido 0,003 N.

11.14. Mezclar bien la muestra utilizando una pipeta de 1000 µL, aspirando y expulsando la muestra dentro de la cubeta pero sin airearla demasiado (para esto no se debe sacar la punta del tip de la solución). Esperar 90 segundos y medir la absorbancia a 750 nm y 665 nm. Es crítico el mezclado apropiado de la muestra con el ácido para obtener resultados precisos y exactos.

11.15. Si se va a utilizar el mismo material para muestras diferentes realizar un lavado con acetona al 90 % entre cada muestra.

12. ANALISIS DE DATOS

12.1. ECUACIÓN DE LORENZEN para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en el extracto.

- Restar los valores de absorbancia a 750 nm de los valores de absorbancia a 664 nm y 665 nm.
- Calcular las concentraciones de clorofila-a y feofitina-a en el extracto insertando los valores de absorbancia corregidos a las siguientes ecuaciones:

$$C_{E,a} = 26,7 \times (A_{664a} - A_{665d})$$

$$P_{E,a} = 26,7 \times (1,7 \times A_{665d} - A_{664a})$$

donde:

$C_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Clorofila-a en el extracto.

$P_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Feofitina-a en el extracto.

A_{664a} : corresponde a la absorbancia del extracto a 664 nm, corregida por turbidez y medida antes de acidificar.

A_{665d} : corresponde a la absorbancia del extracto a 665 nm, corregida por turbidez y medida después de acidificar.

12.2. ECUACIÓN GENERAL para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en la muestra.

- Calcular las concentraciones de los pigmentos en toda la muestra de agua usando la siguiente ecuación general:

$$C_s = \frac{C_{E(s)} \times \text{volumen de extracto (L)} \times \text{DF}}{\text{volumen de muestra (L)} \times \text{longitud de celda (cm)}}$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración en mg/L de pigmento en toda la muestra de agua.

$C_{E(s)}$: corresponde a la concentración en mg/L del pigmento en el extracto medido en la celda.

Volumen de extracto: corresponde al volumen en L de extracto antes de diluir (típicamente 0,010 L; 10 mL).

DF: corresponde al factor de dilución (en el caso que haya sido necesario diluir la muestra).

Volumen de muestra: corresponde al volumen en L de toda la muestra de agua que se filtró.

Longitud de celda: corresponde al camino óptico en cm de la cubeta usada (típicamente 1 cm).

12.3. Las muestras de agua con una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,70 no contienen feofitina-a. Esto implica que los fotótrofos atrapados en la muestra se encontraban en un excelente estado fisiológico al momento de realizarse el muestreo. Soluciones puras de feofitina-a no registran reducción en la absorbancia a 665 nm luego de la acidificación, presentando entonces una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,0. Por ende, las muestras de agua donde tenemos mezclas de clorofila-a y feofitina-a presentarán una razón de absorción 664 nm/665 nm que variará entre 1,0 y 1,7.

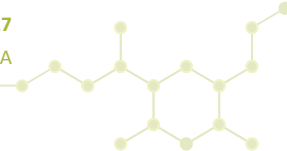
13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Se debe analizar un reactivo blanco por cada corrida de muestras. Este reactivo es un filtro blanco que se extrae y analiza como cualquier otra muestra. Se utiliza para determinar la posible contaminación de reactivos o materiales. Los valores de absorbancia del mismo deben ser < 0,005 U.A.

13.2. Analizar cada cinco muestras, una por duplicado (o al menos 1 duplicado por bach). Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondiente.

13.3. Dado que no es necesaria la calibración del método ni del instrumento con soluciones estándar cada vez que se realice este procedimiento es necesario realizar por lo menos un vez al año una curva de calibración a partir de una solución estándar de clorofila-a utilizando como mínimo 5 puntos con concentraciones entre 1 y 15 mg/L.

La solución estándar de Clorofila-a se debe preparar en ausencia de luz. Se transfiere el contenido de la ampolla (1 mg) a un matraz conteniendo 25 mL de acetona al 90 %. Se logra así una concentración de 40 mg/L. Recubrir el matraz con papel de aluminio para protegerlo de la luz. En la siguiente tabla se muestran



las posibles diluciones para realizar la curva de calibración a partir de la solución estándar de clorofila-a, éstas se llevan a un volumen final de 10 mL.

Los resultados obtenidos deben ser contrastados con los resultados obtenidos en la validación inicial.

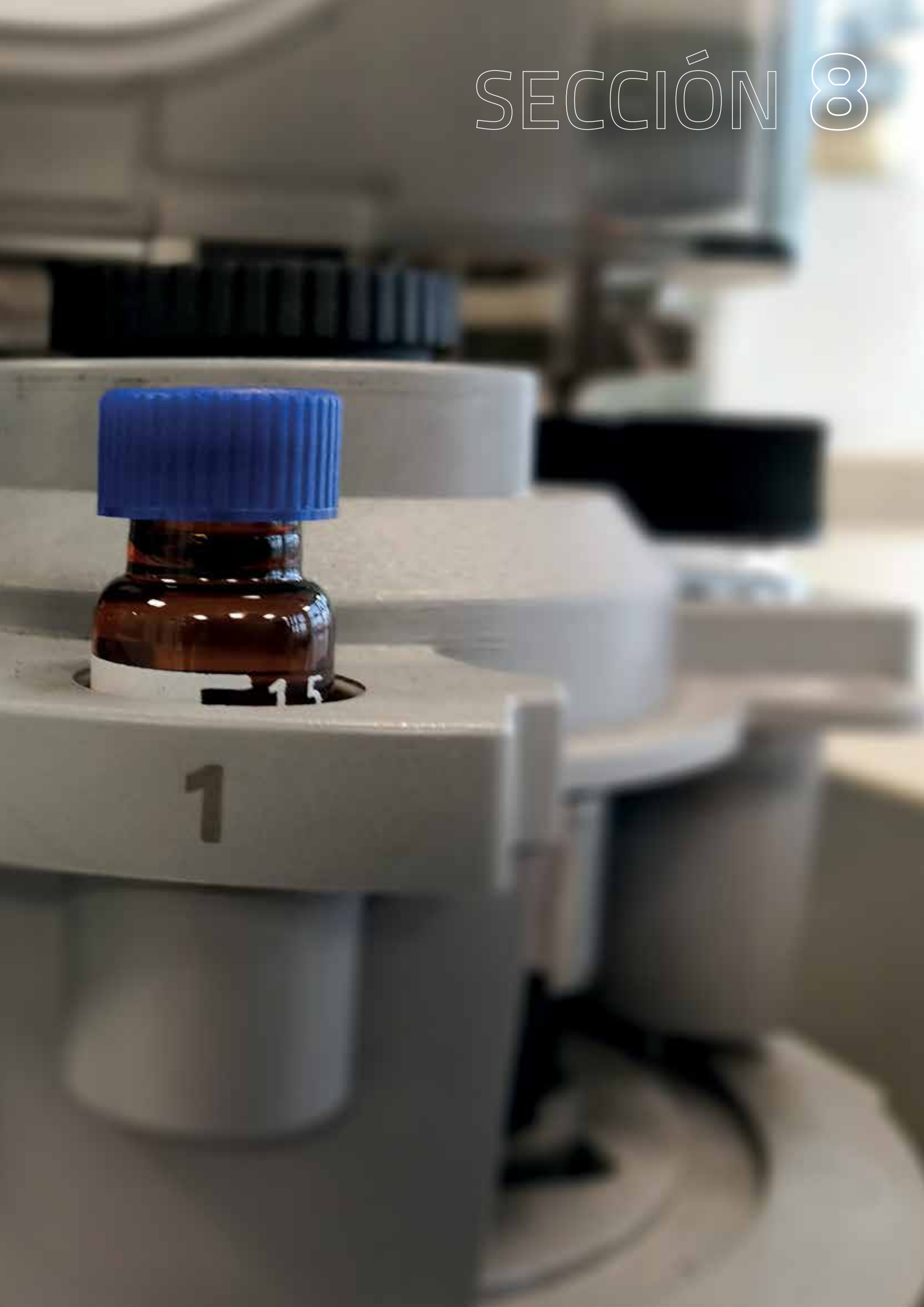
| Concentración de la solución a preparar (mg/L) | Toma de la solución estándar (mL) |
|--|-----------------------------------|
| 1 | 0,25 |
| 3 | 0,75 |
| 6 | 1,5 |
| 9 | 2,2 |
| 12 | 3 |
| 15 | 3,8 |

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1 American Public Health Association (APHA) (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC.
- 14.2 U.S EPA (setiembre 1997). Method 446.0. In Vitro determination of Chlorophylls a, b, c1+c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Revisión 1.2. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. Cincinnati, Ohio.

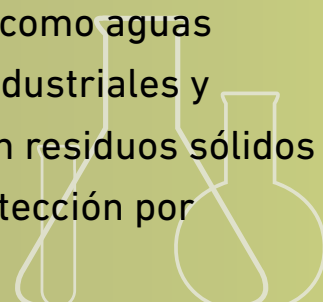


SECCIÓN 8



8084UY

Determinación de AOX en muestras líquidas, como aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales y soluciones resultantes del test de toxicidad en residuos sólidos
Método de adsorción en carbón activado y detección por titulación coulombimétrica

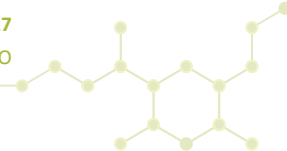


Elaborado - N. Barboza

Modificado - E. Geymonat

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de AOX en muestras líquidas, como aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales, y soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados. El límite de detección es de 8 µg/L, en tanto el límite de cuantificación es de 20 µg/L. El rango de trabajo alcanza los 5 mg Cl/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia, para la determinación de constituyentes no volátiles.” (3261UY)
- 2.6. Instructivo de uso del equipo de determinación Analytik Jena Multi X 2000 (INE 73)
- 2.7. Instructivo de uso de módulo AP2P, Analytik Jena, para método por columna (INE 74)
- 2.8. Instructivo de uso de módulo DF3U, Analytik Jena, para método batch (INE 75)
- 2.9. Instructivo de uso de balanza Precisa de plato abierto (INE 06)
- 2.10. Instructivo de uso del baño con agitación y temperatura (INE 68)
- 2.11. Instructivo de destilador y Milli Q (INE 28, INE 36)
- 2.12. Ruta de análisis código (RIN 32)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) se definen como la suma de los compuestos halogenados (halógenos: cloro, bromo y yodo) posibles de ser adsorbidos en carbón activado. Los haluros inorgánicos extraídos por el carbón activado, son desplazados con una solución de nitrato de sodio acidificada. El carbón activado conteniendo los AOX sufre un proceso de combustión frente a corriente de oxígeno donde se forman los haluros de hidrógeno (HCl, HBr, HI). El gas de combustión conteniendo los haluros de hidrógeno es secado con ácido sulfúrico antes de ingresar a la celda coulombimétrica, donde, mediante una valoración argentométrica, se determina la concentración másica de cloruro. Los AOX se expresan como mg Cl/L.

4 PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. La presencia de cloro activo y algunos compuestos inorgánicos de iodo y bromo, pueden dar valores elevados de AOX. El agregado de una solución de sulfito de sodio 1 M (hasta 10 mL por litro de muestra) enseguida del muestreo puede evitar la reacción de estos agentes oxidantes con los compuestos orgánicos de la muestra. Para verificar la presencia de cloro activo antes o después de la adición de sulfito de sodio, disolver algunos cristales de yoduro de potasio en una porción de muestra y luego agregar una solución de almidón al 1 %; un color azul indica la presencia de cloro activo.
- 5.2. El método es aplicable a muestras con contenido de iones cloruro inorgánicos menores a 1 g/L. En caso de muestras con alta concentración de iones cloruro, el método de adsorción en batch puede presentar más interferencias que el método de adsorción en columna.
- 5.3. Muestras con valores de carbono orgánico disuelto mayores a 100 mg/L (nota: puede considerarse como orientativo un valor de DQO mayor a 100 mg/L), pueden generar un sesgo negativo en los resultados, por lo

que en estos casos se debe analizar una dilución de la muestra de manera de disminuir la materia orgánica interferente. (Según ISO 9562:2004, apartado 9.1, nota 2, se puede asumir una adsorción completa de la muestra si el carbono orgánico disuelto es menor a 10 mg/L)

- 5.4. Alta carga de detergentes interferirán en la medida. Para esto es conveniente diluir la muestra o usar tres columnas en simultáneo. Para este tipo de matrices es necesario chequear que la adsorción haya sido completa, en caso contrario, se requerirá de un prefiltro para aumentar la cantidad de adsorción.
- 5.5. Para muestras con alto contenido de sólidos suspendidos, es preferible el método de batch.
- 5.6. Para muestras con contenido de cloruro mayor a 1 g/L y hasta 100 g/L, y con altos valores de carbono orgánico disuelto (hasta 1000 mg/L), se debe utilizar el método de SPE-AOX descrito en el anexo A de la norma ISO 9562:2004.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio color ámbar, previamente enjuagado con hexano y acetona. 500 mL son suficientes para análisis en aguas naturales y 100 mL para matrices del tipo aguas tratadas. Recolectar la muestra sin cámara de aire, con contratapa de teflón o papel de aluminio.
- 6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Si esto no es posible, acidificar con ácido nítrico (HNO₃ concentrado) hasta pH < 2. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). En esas condiciones el parámetro puede ser determinado hasta 21 días después de extraída la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

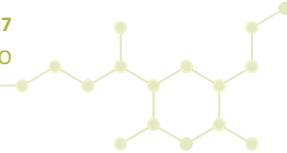
- 7.1. Equipo de extracción, método por columna AP 2P. Analytic Jena.
- 7.2. Equipo de extracción, método por batch (Buchner o DF3U)
- 7.3. Equipo de determinación, MULTI X 2000. Analytic Jena, con sus accesorios:
 - tubo de combustión
 - celda electrolítica
 - tubo barboteador
 - columnas de cuarzo (dimensiones: 16 mm x 8 mm, 16 mm x 10 mm, 20 mm x 10 mm).
- 7.4. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL).
- 7.5. Probetas de 100, 250 y 500 mL.
- 7.6. Matraces aforados de 100 mL, 500 mL y de 1000 mL
- 7.7. Recipientes de vidrio 300 mL aprox. (pueden ser botellas de DBO o frascos Schott).
- 7.8. Balanza de resolución 0,001 g
- 7.9. Baño de agua con control de temperatura y agitación.
- 7.10. Equipo desionizador de agua.
- 7.11. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro.
- 7.12. Filtros de policarbonato de 0,45 µm de tamaño de poro

Nota 1: Todo el material de vidrio debe ser enjuagado con hexano y acetona previo a su uso.

Nota 2: Las marcas mencionadas son las que cuenta el Laboratorio Ambiental de DINAMA. Esto no implica que sea el único que pueda ser utilizado. Cada laboratorio evaluará el equipamiento necesario para la determinación analítica.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua grado 1, según ISO 3696, con contenido de TOC inferior a 10 µg/L.
- 8.2. Ácido acético glacial (C₂H₄O₂ Nro. CAS 64-19-7) 99 %.
- 8.3. Etanol (C₂H₆O Nro. CAS 64-17-5) grado PA.
- 8.4. Solución a: tomar 200 mL de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 mL. Agregar 500 mL de agua 8.1 y 4 mL de HNO₃ concentrado. Llevar a volumen con agua 8.1. Esta solución es estable por 6 meses en el refrigerador



- 8.5. Solución **b1**: agitar 4 g de gelatina en 400 mL de agua 8.1 durante 3 horas. Disolver a temperatura entre 35 y 45 °C.
- 8.6. Solución **b2**: disolver 1,0 g de timol ($C_{10}H_{14}O$ Nro. CAS 89-83-8), y 0,3 g de azul de timol ($C_{27}H_{30}O_5S$ Nro. CAS 76-61-9) en 500 mL de metanol (CH_3OH Nro. CAS 67-56-1) grado plaguicida.
- 8.7. Solución **b**: enfriar solución b1 a 18-22 °C y lentamente agregarla sobre la solución b2. Filtrar sobre un matraz aforado de 1000 mL y enrasar con agua 8.1. Esta solución es estable por 6 meses en el refrigerador. Si se complica el filtrado se puede dejar decantar la gelatina y tomar de la solución sobrenadante.
- 8.8. Solución electrolítica: tomar 8 mL de la solución b en un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con la solución a. Esta solución es estable por 1 mes a 20-25 °C, en recipiente de vidrio ámbar.
- 8.9. Solución nitrato de sodio stock: disolver 17 g de nitrato de sodio ($NaNO_3$ Nro. CAS 7631-99-4) PA en agua. Agregar 25 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) y llevar a un volumen de 1000 mL con agua 8.1. Esta solución es estable por 3 meses en botella de vidrio ámbar.
- 8.10. Solución de nitrato de sodio de lavado: tomar 50 mL de la solución de $NaNO_3$ stock y llevar a 1000 mL con agua 8.1. Esta solución es estable por 1 mes en botella de vidrio ámbar.
- 8.11. Ácido 2-clorobenzoico, solución madre (250 mg/L AOX): en un matraz aforado de 100 mL, se disuelven 110,4 mg de ácido 2-clorobenzoico (C_6H_4COOH Nro. CAS 118-91-2) con agua 8.1 y se lleva a volumen. La disolución del ácido 2-clorobenzoico es muy lenta, por lo que es recomendable prepararla el día previo a su utilización. Esta solución puede conservarse hasta un mes en recipiente de vidrio, y a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C).
- 8.12. 4-Clorofenol, solución stock (200 mg/L de AOX): Disolver 72,5 mg de 4-Clorofenol (C_6H_5ClO Nro. CAS 106-48-9) en agua 8.1 en un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con agua 8.1. Se puede utilizar material de referencia certificado de 4-clorofenol, de 200 mg/L AOX (Merck HC132611 o similar).
- 8.13. Ácido clorhídrico diluido (HCl Nro. CAS 7647-01-0): Concentración 0,010 mol/L. La molaridad debe ser conocida exactamente ya que se usa para chequear la titulación.
- 8.14. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2), 65 % (densidad 1,4 g/mL)
- 8.15. Ácido nítrico diluido, 0,02 mol/L. Esta dilución se utiliza como blanco de reactivo.
- 8.16. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9), 1,84 g/mL.
- 8.17. Solución de sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7). Disolver 126 g de Na_2SO_3 PA con agua en un matraz de 1000 mL. Esta solución es estable durante un mes si se conserva a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C)
- 8.18. Ioduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0), calidad PA.
- 8.19. Solución de almidón ($[C_6H_{10}O_5]_n$ Nro. CAS 9005-25-8), con una fracción másica de 1 %.
- 8.20. Carbón activado para método de adsorción **por columna**: tamaño de partículas: 50-150 μm , índice de yodo > 1050 y valor de blanco < 15 $\mu g/g$ Cl. Marca Analytik Jena, código: 402-810.004 o similar.
- 8.21. Carbón activado para método de adsorción **por batch**: tamaño de partículas: 50-150 μm , índice de yodo > 1050 y valor de blanco < 15 $\mu g/g$ Cl. Marca Analytik Jena, código: 402-810.025 o similar.
- 8.22. Carbón activado para filtro: marca Analytik Jena, código: 402-810.031 o similar.
- 8.23. Oxígeno, pureza 99,95%.
- 8.24. Lana de cerámica: muflar a 550 °C por dos horas antes de usar. Guardar en tubo de vidrio limpio con tapa rosca.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

Siempre antes de comenzar con las muestras, es necesario realizar las siguientes etapas con el equipo utilizado para la determinación:

- 9.1. Retirar el tubo de combustión, extraer las columnas que hayan quedado del día anterior, y sin tocar con los dedos, enjuagar el exterior del mismo con etanol.
- 9.2. Descartar el H_2SO_4 del tubo barboteador, y rellenar con una nueva porción de 15 mL. Si se encuentran gotas en las paredes arrastrarlas con agua, previo al agregado del nuevo ácido.
- 9.3. Descartar la solución electrolítica, enjuagar con una nueva porción y colocar entre 15 y 20 mL de nueva

solución electrolítica. Verificar la fecha de vencimiento. Si por alguna razón se requiere repetir el end point routine del equipo, cambiar la solución electrolítica.

- 9.4. Verificar el estado del electrodo y de la pastilla magnética de la celda. La pastilla magnética no deberá contener depósitos sólidos, de lo contrario limpiarla cuidadosamente con una lija de papel.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Soluciones de verificación: a partir del estándar 8.11 u 8.12 preparar al menos 5 soluciones estándares (por ejemplo 30, 50, 100, 150 y 250 µg/L AOX). Se comparan los resultados medidos con los resultados nominales (% recuperación) y se grafica la concentración nominal (x) vs la concentración medida (y). El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,999 y los % de recuperación deben estar entre 95 -105 %.

Estas soluciones de verificación se analizan al menos una vez al año.

- 10.2. Solución control: a partir del estándar 8.11 u 8.12 preparar una solución de concentración final 50 µg/L o 100 µg/L AOX. Cada 100 mL de solución, se agregan 5 mL de solución stock de nitrato de sodio, y se lleva a pH < 2 con HNO₃ (0,2 mL de HNO₃ concentrado es suficiente).

- 10.3. Se registra la toma del estándar original y el volumen final de la solución, en la ruta de análisis correspondiente.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Para aguas naturales, tomar 100 mL de muestra y analizar sin dilución. Los efluentes industriales deben analizarse diluidos (mínimo 1/20) tomando no menos de 5 mL de muestra y llevando a 100 mL con agua 8.1. Registrar la toma de muestra y el volumen final en el RIN 32.

Nota 4: Las tomas de muestra se realizan en balanza con resolución de 0,001 g. Se considera la densidad de la muestra igual a 1 g/mL; en caso contrario, corregir según la densidad de la muestra inicial y final.

- 11.2. Acidificar la porción de muestra hasta pH < 2 con HNO₃ si no fue preservada en el momento de recepción de la misma (para aguas naturales y efluentes industriales diluidos 0,2 mL de HNO₃ concentrado en general es suficiente).

- 11.3. Adicionar 5 mL de solución stock de nitrato de sodio, cada 100 mL de muestra (o dilución de muestra apropiada).

- 11.4. Adsorción de la muestra en carbón activado.

11.4.1. Método de columna

- 11.4.1.1. Preparar diariamente las columnas de carbón activado (columnas de cuarzo de 16 mm x 10 mm con lana de cerámica muflada en los extremos) y cargar los dúplex.

- 11.4.1.2. Verificar nivel de NaNO₃ de lavado en el recipiente correspondiente y cantidad de muestra suficiente

- 11.4.1.3. Colocar las muestras sobre los agitadores magnéticos del módulo AP2P, agregando una pastilla magnética.

- 11.4.1.4. Seguir los pasos del INE 74 (por cada par de muestras, la extracción tarda aproximadamente 35 minutos)

- 11.4.1.5. Retirar los dúplex y colocarlos sobre papel para eliminar el exceso de agua.

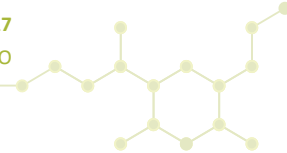
Nota 5: Para muestras con alta carga de partículas, es conveniente utilizar el triplex, siendo la primera columna un filtro de lana de cerámica. Si la muestra además contiene altas cantidades de detergente, es conveniente utilizar la primera columna (del triplex) con carbón activado. Posteriormente se queman las tres partes, y por lo general es el prefiltro y la primera columna juntas y después la segunda columna.

Nota 6: Para muestras salinas, es conveniente utilizar SPE AOX, pero hay que mencionarlo en el reporte ya que a partir de esta modificación del procedimiento no se determinan AOX totales.

11.4.2. Método de batch

- 11.4.2.1. Agregar 50 mg de carbón activado para método batch (8.23) a la muestra.

- 11.4.2.2. Agitar la muestra durante una hora en baño de agua INE 68.



11.4.2.3. La filtración puede hacerse por dos maneras diferentes:

11.4.2.3.1. Método de filtración con Büchner

- Tomar la muestra y filtrarla a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro de 0,45 μm , y diámetro 47 mm.
- Llenar la columna de cuarzo (20 x 10) con cerámica de vidrio, aproximadamente 70 % de la capacidad.
- Enjuagar con 25 mL de NaNO_3 desde una pisseta, el recipiente utilizado para la agitación, incluyendo el tapón para arrastrar todo el carbón que pueda haberse quedado retenido. No es posible utilizar más de 25 mL de NaNO_3 porque puede disminuir la recuperación de AOX
- No secar demasiado con la filtración, para evitar adsorber compuestos halogenados del ambiente de trabajo y evitar secar el carbón activado.
- Con la ayuda de 2 pinzas, doblar dos veces el filtro de policarbonato para poder colocarlo dentro de las columnas de cuarzo de 20 mm x 10 mm conteniendo la lana de cerámica.
- Colocar nuevamente lana de cerámica sobre el carbón.

11.4.2.3.2. Método de filtración con módulo DF 3U

- Seguir las instrucciones del INE 75.
- Lavar los recipientes de filtración previo al uso con solución stock de NaNO_3 . Si continúan sucios, utilizar etanol como solvente de limpieza.
- Cubrir un 70 % de las columnas de cuarzo de 20 mm x 10 mm con lana de cerámica
- Cerrar las tapas de cada recipiente de filtración, y prender la bomba para hacer vacío.
- Volcar rápidamente las muestras para evitar que el carbón quede en el vaso original.
- Enjuagar las muestras y los recipientes de filtración con NaNO_3 de lavado (máximo 25 mL)
En el último enjuague, secar las columnas pero no demasiado para no introducir contaminación del ambiente de trabajo a la columna y evitar secar el carbón activado.
- Colocar nuevamente lana de cerámica sobre el carbón activado.

Nota 7: Las columnas con lana de cerámica utilizada pueden limpiarse tal cual en el tubo de combustión, o en mufla a 1000 °C previo al uso, debiendo retirar el carbón activado anterior.

11.5. Una vez realizada la adsorción por cualquiera de los métodos propuestos seguir las instrucciones en el INE 73

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. **Método de absorción por columna:** el equipo reporta un valor absoluto de Cl^- por cada columna analizada. Cargar estos datos en la planilla de cálculo. El valor de AOX, en $\mu\text{g/L}$ se calcula de la siguiente forma:

$$\text{AOX } (\mu\text{g/L}) = \frac{(\mu\text{g Cl}^- \text{ columna 1} + \mu\text{g Cl}^- \text{ columna 2}) \times 1000 \times \text{FD}}{\text{V muestra adsorbida (mL)}}$$

donde:

V muestra adsorbida = 50 mL (adsorción realizada con módulo AP 2P)

FD: corresponde al V final, g (incluyendo agregado de solución stock de NaNO_3 y HNO_3) / toma de muestra, g

Nota 8: Tratar el blanco como una muestra. En caso que amerite, se corrige el valor absoluto de Cl^- de la muestra con el valor absoluto de Cl^- del blanco. Lo que puede ser cargado directamente en el software (measuring sample data).

12.2. Método de adsorción por batch:

$$\text{AOX } (\mu\text{g/L}) = \frac{\mu\text{g Cl}^- \text{ columna} \times 1000 \times \text{FD}}{V \text{ muestra (mL)}}$$

donde:

FD corresponde al V final, g (incluyendo agregado de solución stock de NaNO_3 y HNO_3) / toma de muestra, g

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Controles del equipo utilizado para la determinación:

- 13.1. Empty sample: se trata una posición vacía del autosampler como una muestra. El contenido absoluto de cloruro no deberá superar los 0,2 μg .
- 13.2. Cell test: Agregar 20 μL de HCl 0,01N directamente a la celda coulombimétrica. El contenido absoluto de cloruro debe ser de 7,10 $\mu\text{g Cl} \pm 5 \%$ (6,74 – 7,46 $\mu\text{g Cl}$)
- 13.3. Oven test: Fortificar una columna de cuarzo (de 18 x 10 mm) con lana de cerámica con 50 μL de HCl 0,01 N y tratarla como una muestra. El contenido de cloruro absoluto debe ser de 17,75 $\mu\text{g Cl} \pm 5 \%$ (16,86 – 18,64 $\mu\text{g Cl}$)

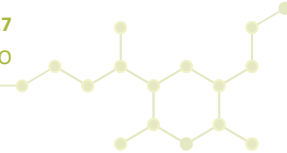
Controles analíticos:

- 13.4. **Control de exactitud:** Analizar en cada corrida una solución control preparada según 10.2. El porcentaje de recuperación debe estar en el rango de 90-110 %; en caso de no cumplirse, se evaluará la repetición del análisis. Los porcentajes de recuperación se registran en un gráfico de control con límites de control fijos en 90 y 110 %.
- 13.5. **Control de precisión:** Analizar un duplicado cada 5 muestras en el caso de muestras de aguas naturales, mínimo un duplicado por serie de muestras. Los efluentes industriales se analizan todos por duplicado. Se acepta hasta un 20 % de dispersión, expresada como rango normalizado de duplicados. En el caso de trabajar con diluciones distintas se acepta el promedio de ambas siempre y cuando la dispersión sea menor que 10 %, de lo contrario repetir el análisis con la mayor dilución.
- 13.6. **Control de blancos:** En cada corrida, analizar al menos un blanco de reactivos (8.15). Se aceptan los blancos si la concentración de AOX en los mismos es inferior a 30 $\mu\text{g/L}$ (para un volumen de muestra de 100 mL). En caso que amerite, se podrá restar el aporte del blanco a las muestras analizadas (en particular, cuando se realizan diluciones de las muestras, considerando el aporte del agua desionizada utilizada para diluir). Los valores de los blancos se registran en un gráfico de control de blancos.
- 13.7. **Control del carbón activado (para el método de adsorción en columna):** en cada corrida, analizar al menos una columna de cuarzo con carbón activado para evaluar su aporte. En caso que amerite, se podrá restar el aporte de la misma para obtener el resultado de AOX en la muestra/control.
- 13.8. **Chequeo de adsorción:** Cuando se realice adsorción por método de columna, se debe calcular la eficacia de la adsorción (EA), según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ EA} = \frac{(\mu\text{g Cl}^-_{\text{columna 2 muestra}} - \mu\text{g Cl}^-_{\text{columna 2 blanco}}) \times 100}{[(\mu\text{g Cl}^-_{\text{col 1 muestra}} - \mu\text{g Cl}^-_{\text{col 1 blanco}}) + (\mu\text{g Cl}^-_{\text{col 2 muestra}} - \mu\text{g Cl}^-_{\text{col 2 blanco}})]}$$

El % EA deberá ser menor o igual al 25 % para aceptar el análisis; de lo contrario evaluar la repetición del análisis con una dilución mayor.

- 13.9. En casos de matrices complejas o que el análisis presente anomalías, es posible analizar la muestra fortificada y evaluar el porcentaje de recuperación de la adición. Para la adición se utilizara la misma solución utilizada para 13.4
- 13.10. En el caso de análisis de aguas, fortificar al menos una muestra por batch (mínimo 1 cada 10), de manera de asegurar el límite de cuantificación.



14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. Método ISO 9562:2004. Determinación de compuestos halogenados adsorbibles (AOX).
- 14.2. Manual de Instrucciones de operaciones multi X 2000. IDC Analytic System. Analytic Jena.
- 14.3. Manual de Instrucciones de operaciones AP 2P. Analytic System. Analytic Jena.
- 14.4. Manual de Instrucciones de operaciones DF 3U. Analytic System. Analytic Jena
- 14.5. EPA 1650 Revision C, 1997. Adsorbable Organic Halides by Adsorption and Coulometric Titration.

8085UY

Determinación de bifenilos policlorados (PCB)
en muestras de aceites dieléctricos

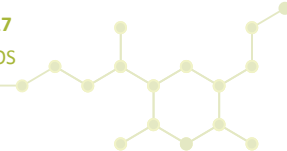


Elaborado - E. Geymonat

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de PCB en aceites dieléctricos. El rango de medida es entre 1 y 138 mg/kg, el cual puede ampliarse a través de diluciones de las muestras.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Ruta de análisis código (RIN 34)
- 2.6. Instructivo de uso del cromatógrafo de gases Varian 450-GC (INE 82)
- 2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 16)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se diluye la muestra en hexano y se purifica el extracto con ácido sulfúrico. Se seca el extracto orgánico con sulfato de sodio anhidro y se analiza por cromatografía gaseosa.
- 3.2. El extracto obtenido en hexano es inyectado en un cromatógrafo de gases y los bifenilos policlorados son separados según su afinidad por la fase estacionaria de la columna.
- 3.3. La identificación de los PCB presentes en la muestra se realiza por comparación de los tiempos de retención del cromatograma de la muestra con el de los estándares inyectados en la misma serie de análisis. Se utiliza un detector de captura electrónica (ECD).
- 3.4. La cuantificación de PCB se realiza comparando el área total de los picos de un estándar de Aroclor con el área total de los picos de ese Aroclor en la muestra. Se utiliza aquel estándar cuya concentración es más próxima a la concentración estimada de la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.
- 4.4. Todos los reactivos se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Posibles interferencias son otros compuestos que posean en su estructura átomos electronegativos, como halógenos, oxígeno, nitrógeno y azufre, y que son detectados por el detector ECD. Otras interferencias pueden ser aditivos de aceites que no son eliminados con ácido sulfúrico.
- 5.2. Pftalatos (presentes en plásticos, como septas, tapas, etc).
- 5.3. Las interferencias mencionadas no pueden ser eliminadas en el pre-tratamiento de las muestras.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en envase de vidrio con contratapa de teflón. Un volumen de 30 mL es suficiente.
- 6.2. Se recomienda analizar los aceites antes de cumplidos los 30 días de extraída la muestra. Preservar las muestras a temperatura ambiente.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Pipetas aforadas de 1,00; 2,00; 5,00 y 10,00 mL
- 7.2. Tubos de ensayo de borosilicato de 15 mL y de 25 mL, en lo posible descartables.

- 7.3. Balanza de resolución 0,001 g (Precisa 500M-2000C) (IN 20)
- 7.4. Balanza de resolución 0,00001 g (Sartorius R200D) (IN 19)
- 7.5. Matraces aforados de 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; y 100,00 mL
- 7.6. Cromatógrafo de gases marca Varian, modelo 450-GC equipado con:
 - Columna de 0,53 mm ID, 30 m; 1,5 um film thickness, fase estacionaria CP-Sil 5CB o similar
 - Detector de captura electrónica (ECD)
 - Inyector Split/splitless
 - Autosampler marca Varian, modelo 8410 (10 posiciones)
- 7.7. Vortex marca Super Mixer (MB 123)
- 7.8. Pipetas Pasteur de vidrio
- 7.9. Viales de vidrio de 2 mL con precinto o tapa rosca con septo PTFE.
- 7.10. Jeringas de 250 µL y de 1 mL.

8. REACTIVOS

- 8.1. Ácido sulfúrico, H₂SO₄ 98 % w/w Nro. CAS 7664-93-9 (Biopack o similar)
- 8.2. Hexano grado plaguicida CH₃(CH₂)₄CH₃ Nro. CAS 110-54-3 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.3. Acetona grado plaguicida (CH₃)₂CO Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.4. Sulfato de sodio anhidro Na₂SO₄ Nro. CAS 7757-82-6, calidad para análisis
- 8.5. Estándares de Aroclor 1242, 1254 y 1260 de 1000 µg/mL, Supelco o similar
- 8.6. Nitrógeno alta pureza (99,999 %)

Nota 1: Reactivos para análisis (PA) son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Evitar contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.
- 9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para la etapa extracción y purificación debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de PCB. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.
- 9.3. Todo el material de vidrio contaminado con PCB debe enjuagarse luego de su uso con hexano y/o acetona para arrastrar residuos de PCB. Las soluciones de descarte contaminadas con PCB deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados. Posteriormente, lavar el material de vidrio con detergente y agua y dejar secar. Realizar doble enjuague con acetona y dejar secar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

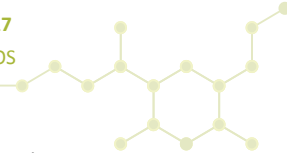
Preparación de estándares

- 10.1. Preparar diluciones seriadas de los estándares 8.5, en hexano 8.2. Las concentraciones a utilizar para la cuantificación serán 20 µg/L, 60 µg/L, 500 µg/L y 1000 µg/L de cada Aroclor. En caso de ser necesario, pueden prepararse diluciones de los estándares 8.5 de concentraciones diferentes a las mencionadas. La vigencia de las diluciones es de 12 meses (conservar en freezer).
- 10.2. Realizar todas las diluciones utilizando material de vidrio aforado o jeringas 7.10.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Homogeneizar la muestra por agitación manual.
- 11.2. Colocar un tubo de ensayo de 25 mL en la balanza IN 20 y tarar. Agregar con pipeta Pasteur 0,1 g de muestra. Registrar la toma de muestra en el RIN 34.
- 11.3. Agregar con pipeta aforada de 5 mL de hexano 8.2. Agitar suavemente el tubo para mezclar el aceite con el solvente. Realizar esta actividad bajo campana de extracción de gases.

Nota 2: La relación entre la cantidad de muestra y el volumen de hexano debe ser de al menos 1:50.



11.4. Agregar 2,5 mL de ácido sulfúrico 8.1 con dispensador. Agitar en vortex para mezclar las fases (10-15 segundos).

Nota 3: La relación entre el volumen de hexano y el volumen de ácido sulfúrico debe ser 2:1

11.5. Esperar 5 minutos para que se separen las fases orgánica y acuosa (inferior). Con pipeta Pasteur, pasar la fase orgánica a un tubo de ensayo de 15 mL. Tener la precaución de no arrastrar fase acuosa, ya que el ácido sulfúrico puede dañar la columna del cromatógrafo de gases.

11.6. Secar la fase orgánica con la cantidad necesaria de sulfato de sodio 8.4. tomando como criterio de que el extracto está seco cuando el sulfato de sodio es fácilmente resuspendible por agitación manual.

11.7. Con pipeta Pasteur, trasvasar una alícuota del extracto a un vial de 2 mL y tapar herméticamente.

11.8. Prender el cromatógrafo de gases según el INE 83. Seleccionar el método: 1242-1254-1260 Arocloros Individuales y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

| | |
|-------------------|---|
| Inyector: | - Temperatura: 260 °C - Modo inyección: splitless |
| Horno: | - Temperatura inicial: 150 °C mantener por 1 minuto - Rampa 5 °C/min hasta 280 °C, mantener por 3 minutos Tiempo total de corrida: 30 minutos |
| Detector ECD: | - Temperatura: 300 °C - Make-up: 20 mL/min, nitrógeno de alta pureza |
| Flujo en columna: | - 10 mL/min nitrógeno de alta pureza |
| Autosampler: | - Volumen de inyección de 1 µL - Puerto de inyección Front (ECD) |

Nota 4: Puede ser necesario modificar las condiciones cromatográficas descritas en el punto 11.8 (por cambios de sensibilidad, trabajo a presión constante, etc.). En ese caso, se debe verificar que se obtienen resultados comparables en las distintas condiciones de análisis.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Comparar el perfil cromatográfico de la muestra con el perfil de los estándares de Arocloros 1242, 1254 y 1260.

12.2. Se define en el método cromatográfico que los picos identificados con los números 11 al 78 se cuantifican como Aroclor 1242 (Grupo 1, del reporte que genera el equipo), y los picos del 84 al 528 se cuantifican como Aroclor 1260 (Grupo 2 del mismo reporte).

Para el Aroclor 1254 se deben considerar los picos 47, 54, 58, 70, 84, 98, 104, 125, 146, 160, 174, 203 y 232. Sólo se cuantificarán los PCB como este Aroclor, cuando el perfil cromatográfico de la muestra presente claramente los picos detallados más arriba. De lo contrario, cuantificar como la suma del 1242 y 1260.

12.3. Criterios de integración:

- i- En cuanto a cromatogramas de muestras analizadas, en los cuales el perfil no se corresponde con los encontrados en Estándares de Aroclor (1242, 1254 y 1260), estos picos no se consideran para la suma de PCB.
- ii- En cuanto a cromatogramas de muestras analizadas, en los cuales el perfil coincide parcial o totalmente con los encontrados en Estándares de Aroclor (1242, 1254 y 1260), esto es, algunos PCB guardan coherencia de alturas y tiempo de retención entre ellos, estos picos sí son considerados para la suma de PCB
- iii- Se consideran picos "fantasma", a aquellos que claramente salen por lo menos en un 100% del perfil clásico de Aroclor; éstos no son considerados para la suma total de PCB.
- iv- En cuanto a la línea de base, esta se debe ajustar tomando su altura en el tiempo de retención correspondiente al inicio del primer pico de PCB correspondiente al Aroclor en cuestión, y considerando su altura final en el tiempo de retención correspondiente al final del último pico de PCB correspondiente al Aroclor en cuestión. Este criterio puede ser sustituido, considerando un punto medio en la línea de base que coincida con el valle más alto encontrado en el Aroclor.

12.4. La cuantificación se realiza por comparación de áreas totales. Se compara el área total del Aroclor

en la muestra con el área total del Aroclor en la solución estándar, cuya concentración sea próxima a la concentración estimada de la muestra.

12.4.1 Muestra conteniendo mezcla de Arocloros 1242 y 1260:

Del reporte del equipo correspondiente a las muestras y a los estándares de Arocloros analizados, tomar el dato del área total del Aroclor 1242 (Grupo 1) y 1260 (Grupo 2).

Calcular la concentración según la siguiente fórmula:

$$C_{1242, m} (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{Á}_{1242, m} \times C_{1242, \text{std}} (\mu\text{g/L})}{\text{Á}_{1242, \text{std}}}$$

donde:

$C_{1242, m}$ ($\mu\text{g/L}$): corresponde a concentración del Aroclor 1242 en la muestra

$C_{1242, \text{std}}$ ($\mu\text{g/L}$): corresponde a concentración de la solución estándar del Aroclor 1242, más próxima a la concentración estimada de la muestra.

$\text{Á}_{1242, m}$: corresponde a área total de los picos del Aroclor 1242 en la muestra

$\text{Á}_{1242, \text{std}}$: corresponde a área total de los picos del Aroclor 1242 en la solución estándar de concentración $C_{1242, \text{std}}$ ($\mu\text{g/L}$)

La concentración del Aroclor 1260 en la muestra se calcula de manera análoga.

12.4.2 Muestra conteniendo sólo Aroclor 1254

Para el Aroclor 1254, calcular de manera análoga, considerar el área total como la suma de las áreas de los picos 47, 54, 58, 70, 84, 98, 104, 125, 146, 160, 174, 203 y 232, y calcular la concentración de manera análoga a los Arocloros 1242 y 1260.

12.5. Calcular la concentración del aceite, en mg PCB totales/kg (considerando que contiene mezcla de Aroclor 1242 y 1260), según:

$$C_{\text{final, m}} (\text{mg PCB totales/kg}) = \frac{[C_{1242, m} (\mu\text{g/L}) + C_{1260, m} (\mu\text{g/L})] \times V_f (\text{mL}) \times \text{FD}}{\text{Toma (g)} \times 1000}$$

donde:

$$V_f (\text{mL}) = \frac{\text{Toma (g)} + V_{\text{hexano}} (\text{mL})}{d_{\text{aceite}} (\text{g/mL})}$$

$d_{\text{aceite}} = 0,89 \text{ g/mL}$ (valor teórico)

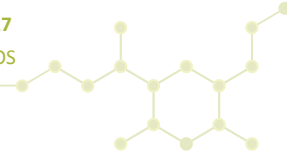
$\text{FD} = V_f \text{ muestra diluida (mL)} / \text{toma de muestra (mL)}$

En caso de que el aceite contenga únicamente el Aroclor 1254, proceder de manera análoga. La fórmula a aplicar en ese caso es la siguiente:

$$C_{\text{final, m}} (\text{mg PCB totales/kg}) = \frac{C_{1254, m} (\mu\text{g/L}) \times V_f (\text{mL}) \times \text{FD}}{\text{Toma (g)} \times 1000}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Analizar junto con las muestras un aceite control de concentración conocida o un material de referencia certificado. Se aceptará un valor entre 80 % y 120 % de recuperación. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.



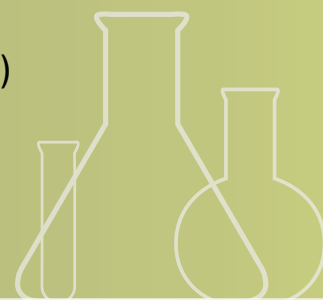
- 13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor al 20 %.
- 13.3. Con cada batch de muestras, se analiza una blanco de reactivos o un aceite blanco.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. ASTM D 4059-00 Standard Test Method for Analysis of Polychlorinated Biphenyls in Insulating Liquids by Gas Chromatography
- 14.2. Manuales del cromatógrafo de gases Varian 450-GC

8086UY

Determinación de bifenilos policlorados (PCB)
en muestras ambientales sólidas

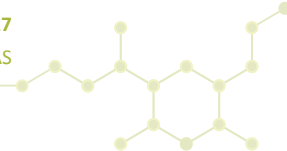


Elaborado - E. Geymonat

Modificado - N. Barboza

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de 7 congéneres de PCB (PCB indicadores: 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) en suelos y sedimentos. El rango de trabajo utilizando el HP 6890 es de:

| Rango de trabajo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | |
|--|------|------|
| PCB 28 | 0,41 | 4,00 |
| PCB 52 | 0,34 | 4,00 |
| PCB 101 | 0,11 | 4,00 |
| PCB 118 | 0,22 | 4,00 |
| PCB 138 | 0,26 | 4,00 |
| PCB 153 | 0,22 | 4,00 |
| PCB 180 | 0,41 | 4,00 |

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del cromatógrafo de gases Varian 450-GC (INE 83)
- 2.6. Instructivo de uso del cromatógrafo de gases HP6890 (INE 67)
- 2.7. Instructivo de uso del espectrómetro de masas (INE 84)
- 2.8. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16)
- 2.9. Ruta para el Registro de datos del espectrómetro de masas-Determinación de PCB en muestras sólidas (RIN 38)
- 2.10. Ruta de análisis (RIN 36)
- 2.11. Ruta de registro de áreas de picos cromatográficos (RIN 37)
- 2.12. Ruta de preparación de estándares (RIN 35)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se extrae la muestra sólida con hexano, en ultrasonido. Se realiza un clean up del extracto utilizando columnas de Florisil. El extracto purificado se concentra bajo corriente de N_2 .
- 3.2. El extracto obtenido es inyectado en un cromatógrafo de gases y los bifenilos policlorados son separados según su afinidad por la fase estacionaria de la columna.
- 3.3. La identificación de los PCB presentes en la muestra se realiza por comparación de los tiempos de retención del cromatograma de la muestra con el de los estándares inyectados en la misma serie de análisis. Se utiliza un detector de captura electrónica (ECD).
- 3.1. La cuantificación de cada congéner de PCB se realiza interpolando el área normalizada (área del congéner/área del estándar interno) en la curva de calibración del respectivo congéner.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Todos los reactivos se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

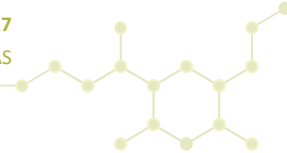
- 5.1. Posibles interferencias son otros compuestos que posean en su estructura átomos electronegativos, como halógenos, oxígeno, nitrógeno y azufre y que son detectados por el detector ECD.
- 5.2. El azufre elemental es comúnmente extraído de muestras de suelos, causando interferencias cromatográficas. Para eliminar este posible interferente se agrega cobre en polvo al suelo, previo extracción.
- 5.3. Pftalatos (presentes en plásticos, como septas, tapas, etc).
- 5.4. Las interferencias mencionadas pueden ser eliminadas previo análisis.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en papel aluminio (toma de aproximadamente 30 g) y luego colocar en bolsa de nylon.
- 6.2. Preservar las muestras en freezer. Almacenar máximo un año hasta la extracción.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Pipetas aforadas de 1,00; 2,00; 5,00 y 10,00 mL
- 7.2. Tubos de vidrio Pirex de 50 mL con tapa rosca
- 7.3. Balanza de resolución de 0,001 g (Precisa 500M-2000C) (IN 20)
- 7.4. Balanza de resolución 0,00001 g (Sartorius R200D) (IN 19)
- 7.5. Matraces aforados de 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; y 100,00 mL
- 7.6. Cromatógrafo de gases marca Varian, modelo 450-GC equipado con:
 - Columna de 0,32 mm ID, 30 m; 1,5 µm film thickness, fase estacionaria CP-Sil 5CB o similar
 - Detector de captura electrónica (ECD)
 - Inyector Split/splitless
 - Autosampler marca Varian, modelo 8410 (10 posiciones)
- 7.7. Cromatógrafo de gases marca HP, modelo 6890 equipado con:
 - Columna BPX5 (SGE) 5 % fenilo, 60 m; 0,25 mm id; 0,25 µm film, o similar
 - Detector de micro captura electrónica (µECD)
 - Inyector split/splitless
- 7.8. Espectrómetro de masas marca Varian, modelo 220-MS equipado con:
 - Columna de 0,25 mm id, 30 m, 0,25 µm film, HP-1 o similar
 - Trampa de iones, que pueda generar espectros comparables con aquellos de la biblioteca NIST, capacidad de escanear de 35 a 500 amu, con 1 scan por segundo.
- 7.9. Vortex marca Super Mixer (MB 123)
- 7.10. Baño de ultrasonido, marca Branson (IN 310)
- 7.11. Baño de agua, marca Büchi (IN 189)
- 7.12. Pipetas Pasteur de vidrio
- 7.13. Viales de vidrio de 2 mL con precinto o tapa rosca con septo PTFE
- 7.14. Jeringas de 10 µL, 50 µL, 250 µL, y de 1 mL
- 7.15. Placas de Petri de 5 cm de diámetro aprox.
- 7.16. Caja de vidrio con tapa ("pecera") para secar las muestras.
- 7.17. Estufa marca Kendro (IN 279)
- 7.18. Mufla marca Thermolyne (FQ 146)
- 7.19. Columnas para cromatografía, de vidrio, 1 cm de diámetro y 20 cm de largo
- 7.20. Filtro de fibra de vidrio, Whatman o similar, de 0,25 µm de diámetro
- 7.21. Lana de vidrio descontaminada mediante tratamiento térmico con mufla



8 REACTIVOS

- 8.1. Hexano grado plaguicida $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ Nro. CAS 110-54-3 (Baker, Mallinckrodt, Biopack o similar)
- 8.2. Acetona grado plaguicida $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.3. Éter etílico grado plaguicida $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ Nro. CAS 60-29-7 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.4. Sulfato de sodio anhidro, calidad para análisis Na_2SO_4 Nro. CAS 7757-82-6 (Fisher o similar)
- 8.5. Cobre en polvo, calidad para análisis (Sigma-Aldrich o similar)
- 8.6. Florisil, 60-100 mesh (Alltech Associates INC o similar)

8.6.1 Preparación de columnas de Florisil:

- i. Colocar lana de vidrio en la parte inferior de las columnas 7.21
- ii. Pesar en balanza 7.3 10 g de Florisil 8.6 (también puede usarse Florisil descontaminado según 11.19) y agregar a la columna. Compactar golpeando suavemente la columna, en posición vertical.
- iii. Envolver la columna preparada en papel aluminio y dejar en estufa a 130 °C por al menos 24 horas antes de ser usadas.

- 8.7. Solución estándar conteniendo mezcla de 7 PCB indicadores, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ChemService o similar)

8.7.1 **Solución estándar de fortificación de 7 PCB:** diluir el estándar 8.7 con acetona hasta una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{L}$. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Conservar en freezer, vigencia 6 meses.

- 8.8. Estándar de decaclorobifenilo ($\text{C}_{12}\text{Cl}_{10}$ Nro. CAS 2051-44-3 estándar interno), pureza 99,9 %, marca Supelco o similar.

8.8.1 Solución estándar madre de decaclorobifenilo: realizar una toma de aproximadamente 0,2 mg del estándar 8.8 y llevar a 100 mL con hexano Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Conservar en freezer, vigencia 12 meses.

8.8.2 **Solución estándar de trabajo de decaclorobifenilo:** diluir con hexano hasta una concentración de aproximadamente 0,1 mg/L. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Preparar con frecuencia trimestral.

- 8.9. Estándar de 2,4,5,6-Tetracloro-m-xileno (estándar subrogado), pureza 98,6 %, marca Supleco o similar.

8.9.1: Solución madre de 2,4,5,6-Tetracloro-m-xileno ($\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_4$ Nro. CAS 877-09-8): realizar una toma de aproximadamente 0,2 mg del estándar 8.9 y llevar a 100 mL con acetona. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Conservar en freezer, vigencia 12 meses.

8.9.2: **Solución estándar de trabajo de 2,4,5,6-Tetracloro-m-xileno:** diluir con acetona hasta una concentración aproximada de 0.1 mg/L. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Preparar con frecuencia trimestral.

- 8.10. Nitrógeno alta pureza (99,999 %)

- 8.11. Helio alta pureza (99,998 %)

- 8.12. Nitrógeno (pureza 99,9 %)

- 8.13. **Mezcla de elución:** preparar una mezcla hexano: éter etílico 96:4. Preparar un volumen mínimo de 100 mL.

Nota 1: Reactivos para análisis (PA) son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Evitar contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.
- 9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para la etapa extracción y purificación debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de PCB. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.
- 9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con PCB así como el material sólido ya extraído deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados. El material de vidrio debe lavarse con detergente y agua. Una vez seco, realizar doble enjuague con acetona y dejar secar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cinco soluciones estándares de 7 PCB, haciendo diluciones seriadas del estándar 8.5, en hexano 8.2, de manera de cubrir todo el rango de trabajo. Registrar la preparación de los estándares en el RIN 35. La vigencia de las diluciones es de 12 meses (conservar en freezer).
- 10.2. Realizar una toma de 1 mL con jeringa 7.14 de cada solución estándar y pasar a un vial de 2 mL con tapa rosca. Agregar 10 µL de la solución 8.8.2 en cada vial. Conservar estos viales en freezer. Vigencia de estos estándares 12 meses.

Nota 2: Tener la precaución de cambiar el septo una vez que los estándares han sido inyectados para evitar su concentración.

- 10.3. Para verificar efecto de la matriz como se indica en punto 13.4, realizar una tercera toma de muestra y adicionarle el estándar 8.7.1, en una concentración cercana al rango medio de la escala de medida. Registrar la adición en el RIN 36. Tratar la muestra adicionada de igual forma que las muestras sin adicionar.

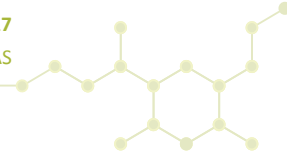
11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

- 11.1. Homogeneizar la muestra, tomar una alícuota de aproximadamente 2 g en una tapa de placa de Petri, pesar en balanza 7.3. Registrar la toma de muestra en el RIN 36.
- 11.2. Colocar las muestras en la "pecera" (en el fondo de la misma debe haber sílica gel). Las mismas deben permanecer en la misma entre 5 y 7 días.
- 11.3. Agregar en un tubo Pyrex de 50 mL la muestra seca. Agregar al mismo tubo aproximadamente 2 g de cobre en polvo 8.5 y aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro 8.4. Agitar para mezclar las distintas fracciones.
- 11.4. Agregar con pipeta graduada 10 mL de hexano 8.1.
- 11.5. Agregar con jeringa 25 µL de solución 8.9.2 y tapar el tubo con la tapa rosca.
- 11.6. Agitar en Vortex (1 minuto aproximadamente).
- 11.7. Dejar la muestra en contacto con el solvente de extracción hasta el día siguiente (al menos 12 horas de contacto).
- 11.8. Agitar nuevamente en Vortex (1 minuto aproximadamente).
- 11.9. Colocar la muestra en el baño de ultrasonido y extraer durante 30 minutos.
- 11.10. Retirar el tubo del ultrasonido y dejar decantar el sólido. Trasvasar el sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio, a un tubo de vidrio de 25 mL con tapa rosca. Agregar otros 10 mL de hexano a la muestra y repetir los pasos 11.10 y 11.11, juntando las dos fracciones extraídas.

Clean-up del extracto

- 11.11. Lavar la columna preparada según 8.6.1 con 10-15 mL de hexano 8.1.
- 11.12. Sembrar el extracto a purificar con pipeta Pasteur de vidrio.
- 11.13. Agregar 40 mL de mezcla de elución 8.13.
- 11.14. Juntar el eluato en tubos de vidrio Pirex de 50 mL.



- 11.15. Colocar el tubo con el extracto purificado en el baño de agua a 60 °C y concentrar con una corriente de nitrógeno 8.12 hasta un volumen final de 1 mL.
- 11.16. Medir el volumen final del extracto purificado y concentrado con jeringa 7.14 y pasar a un vial de 2 mL, con precinto o tapa rosca. Registrar el volumen final del extracto en el RIN 36.
- 11.17. Agregar 10 µL de solución 8.8.2 (IS) e inyectar en el cromatógrafo de gases.
- 11.18. Descontaminación del Florisil usado:
- Desempacar las columnas, colocando el Florisil húmedo en un crisol.
 - Colocar el crisol en estufa, a 130 °C durante 2 horas.
 - Muflar a 650 °C durante 3 horas.

Análisis cromatográfico

- 11.19. Prender el cromatógrafo de gases HP6890, según INE 67. Selecciona
- 11.19. Prender el cromatógrafo de gases HP6890, según INE 67. Seleccionar el método PCBI y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

| | |
|----------------|---|
| Inyector: 2 µL | - Temperatura: 280 °C - Modo de inyección: splitless, con apertura de split a los 0,20 min, flujo a 10 mL/min - Volumen inyección: 2 µL |
| Horno: | - Temperatura inicial: 200 °C, mantener por 1 minuto - Rampa 1.5°C/min hasta 280 °C, mantener por 8 min - Post-run: 0 minutos - Tiempo total de corrida: 62,33 minutos |
| Columna: | - BPX5 (SGE) 5% fenilo, 60 m; 0,25 µm id; 0,25 µm film - Carrier: N ₂ 8.x, 1,4 mL/min |
| Detector: | - Temperatura 290 °C - Make-up: N ₂ 58,6 mL/min |

- 11.20. En caso de realizar el análisis utilizando el cromatógrafo de gases marca Varian, prenderlo según el INE 83. Seleccionar el método: "PCBs indicadores" y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

| | |
|-----------|--|
| Inyector: | - Temperatura: 260 °C - Modo inyección: splitless. - Volumen de inyección |
| Horno: | - Temperatura inicial: 150 °C mantener por 1 minuto - Rampa 5°C/min hasta 280 °C, mantener por 3 minutos - Tiempo total de corrida: 30 minutos |
| Detector: | - Temperatura: 300 °C - Make-up: 20 mL/min, nitrógeno de alta pureza. |
| Columna: | - 1 mL/min nitrógeno de alta pureza. |

Nota 3: las condiciones cromatográficas descritas pueden variar (por cambios de sensibilidad, etc). En ese caso, verificar que no se afecten los resultados obtenidos en las distintas condiciones

Identificación por espectrometría de masas

- 11.21. Prender el MS según el INE 54 y realizar todos los chequeos allí establecidos.
- 11.22. Cargar el método: 7 PCB MS Ventanas y verificar que las condiciones del mismo sean las siguientes:

| | |
|------------------------------------|---|
| Inyector: | - Temperatura: 260 °C - Modo de inyección: splitless con apertura de split en 0,60 min, split de 10 - Volumen inyección: 3 µL |
| Horno: | - T inicial: 150 °C, mantener por 1 minuto - Rampa: 5 °C /min hasta 280 °C, mantener por 1 minuto - Tiempo total de corrida: 28 min |
| Columna: | - HP-1 30 m, 0,25 µm diámetro interno, 0,25 µm film - Carrier: Helio 8.11, 1 mL/min. |
| Detector de masas - Trampa iónica: | - Ionización 3-28 min, rango 40-500 m/z - Scan time: 1 s/scan - Multiplier offset: 0 volts - Emission current: 40 µamps - Count threshold: 1 count - Ion preparation: SIS (single ion storage) |

| Ventanas (min) | Rango (m/z) | Iones (± 1 m/z) |
|----------------|-------------|-----------------|
| 3,00-8,50 | 130-350 | 136-207-256 |
| 8,50-10,50 | 140-350 | 150-186-256 |
| 10,50-12,00 | 140-350 | 220-255-292 |
| 12,00-15,00 | 140-350 | 254-291-326 |
| 15,00-17,00 | 140-350 | 184-256-326 |
| 17,00-18,00 | 140-400 | 290-325-360 |
| 18,00-19,00 | 140-400 | 145-290-360 |
| 19,00-21,00 | 140-500 | 325-359-394 |
| 21,00-28,00 | 140-500 | 214-428-498 |

12. ANÁLISIS DE DATOS

Quantificación utilizando el detector de captura electrónica

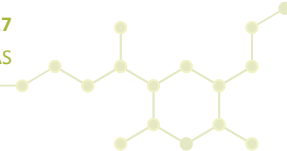
- 12.1. Realizar una inspección visual de los cromatogramas de las muestras y de los estándares. Si los picos cromatográficos presentes en la muestra coinciden en sus tiempos de retención con los respectivos picos cromatográficos en los estándares, se procede a la confirmación a partir de la cuantificación.
- 12.2. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada congéner su área, normalizada por el área del estándar interno (IS), en función de la concentración. La curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma $y = ax + b$, donde "y" es el área del congéner normalizada por el área del IS y "x" la concentración de dicho congéner en la solución estándar, en µg/L.
- 12.3. La concentración de cada congéner en el extracto se calcula interpolando su área, normalizada por el área del estándar interno en el cromatograma de la muestra, en la curva de calibración correspondiente.

$$C_{\text{PCB } i^r} \text{ extracto } (\mu\text{g/L}) = \frac{(\text{Área}_{\text{PCB } i^r} \text{ extracto} / \text{Área IS, extracto}) - b}{a}$$

siendo $i = 28, 52, 101, 118, 138, 153$ y 180

- 12.4. La concentración de cada congéner en la muestra sólida, en µg/kg, se calcula según:

$$C_{\text{PCB } i^r} \text{ muestra } (\mu\text{g/kg}) = \frac{C_{\text{PCB } i^r} \text{ extracto} \times V \text{ final}}{T \text{ muestra}}$$



donde:

$C_{PCB\ i}$, extracto corresponde a la concentración de cada congéner, en $\mu\text{g/L}$ calculada según 12.3

V final: corresponde al volumen final del extracto, en mL

T muestra: corresponde a la toma de muestra, en g

12.5. La concentración en la muestra sólida fortificada se calcula interpolando en la curva de calibración. La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\% \text{ de recuperación} = 100 \times \frac{(C_{PCB\ i'} M_{AD} - C_{PCB\ i'} M) \times V_{\text{final}}}{[(V_{\text{Std Fort}} \times C_{\text{Std fort}}) / V_{\text{final}}] \times T_{\text{muestra}}}$$

donde:

$C_{PCB\ i'}$, M AD: corresponde a concentración de cada congéner en la muestra sólida adicionada, en $\mu\text{g/kg}$, calculada según 12.4

$C_{PCB\ i'}$, M: corresponde a concentración de cada congéner en la muestra sólida sin adicionar, en $\mu\text{g/kg}$

$V_{\text{Std Fort}}$: corresponde a volumen de estándar de fortificación 8.7.1 adicionado a la muestra, en μL

$C_{\text{Std fort}}$: corresponde concentración del estándar de fortificación 8.7.1, 100 $\mu\text{g/L}$.

Identificación por espectrometría de masas (datos registrados en RIN 38)

12.6. Los criterios a considerar son los siguientes:

- i. El tiempo de retención relativo (RRT) de cada congéner en la muestra debe ser $\pm 0,06$ unidades de RRT respecto al RRT de dicho congéner en la solución estándar inyectada junto con el batch de muestras.

Nota 4: el RRT se define como el cociente entre el tiempo de retención del congéner y el tiempo de retención del estándar interno.

Nota 5: la solución estándar a inyectar debe ser de una concentración $\geq 4 \mu\text{g/L}$ para poder visualizar la señal de los congéneres.

- ii. Las intensidades (abundancias) relativas de los iones característicos de cada congéner en la muestra deben estar dentro del 30 % de las intensidades relativas de esos iones en el espectro de referencia (espectro de la solución estándar analizada con el batch).

Consideraciones para la información de resultados

1. Si en la cromatograma obtenido con el detector de captura electrónica no se ven picos que coincidan con los tiempos de retención de los congéneres (o si la concentración calculada del congéner en la muestra está por debajo del LCM correspondiente), se informa la concentración de cada PCB como menor al LCM obtenido con el detector de captura electrónica.
2. Para poder confirmar la identidad de los analitos con el detector de masas según apartado 12.6 de este procedimiento, la concentración de cada congéner en la muestra debe ser mayor a 2 $\mu\text{g/kg}$.
3. Si la concentración calculada de los congéneres en la muestra es menor a 2 $\mu\text{g/kg}$, se informan como menor a 2 $\mu\text{g/kg}$ y (no se confirma por MS).
4. Si la concentración calculada es mayor a 2 $\mu\text{g/kg}$, se procede a la confirmación según apartado 12.6 y si se cumplen los criterios establecidos se informa el valor de concentración obtenido con el detector de captura electrónica.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Evaluarla, de ser posible, analizando junto con las muestras un material de referencia certificado cuya matriz sea similar a la de las muestras. Se aceptará un valor de recuperación en el rango 80-120 % para cada congéner o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

- 13.2. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras (toma independiente de muestra). Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 25 %, para cada congéner.
- 13.3. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza una blanco de reactivos, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas.
- 13.4. **Control de recuperación de fortificaciones:** Medir la muestra y la muestra fortificada, calcular la recuperación de la adición según 12.5., la cual debe estar dentro del rango 60-130 % del contenido real, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos.

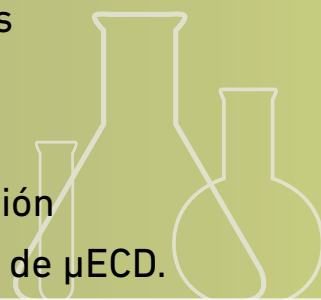
14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. EPA Method 8082 Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Gas Chromatography
- 14.2. EPA Method 3550 Ultrasonic Extraction
- 14.3. EPA Method 8270 Semivolatile Organic Compounds by GC/MS
- 14.4. Manuales del cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas Varian (450-GC y 220-MS) (Carpeta A-1)
- 14.5. Manual del cromatógrafo de gases HP 6890

8087UY

Determinación de plaguicidas organoclorados
en aguas naturales

Extracción en Fase Sólida (SPE) y determinación
por Cromatografía Gaseosa (GC) con detector de μ ECD.

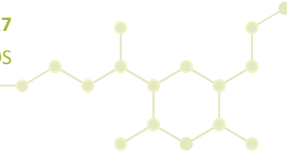


Elaborado - A. Mangarelli

Modificado - E. Geymonat

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental



1 APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de 13 plaguicidas organoclorados: Aldrin, Dieldrin, Heptaclor, Lindano (γ -hexaclorociclohexano), Metoxiclor, α endosulfan, β endosulfan, Endosulfan sulfato, p,p' DDE, p,p' DDD y p,p' DDT, endrin y heptacloro epóxido (isómero B) en aguas naturales, en los siguientes rangos de trabajo:

| Compuesto | Número CAS | Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) | Rango de trabajo * ($\mu\text{g/L}$) | Limite de detección ($\mu\text{g/L}$) |
|-------------------------------|------------|----------------------------------|--|---|
| Lindano | 58-89-9 | 0,0007-0,020 | 0,0007-1,00 | 0,0001 |
| Heptaclor | 76-44-8 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |
| Aldrin | 309-00-2 | 0,002-0,020 | 0,002-1,00 | 0,0006 |
| Heptaclor epóxido (isómero B) | 1024-57-3 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |
| α endosulfan | 959-98-8 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |
| p,p' DDE | 72-55-9 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |
| Dieldrin | 60-57-1 | 0,0002-0,020 | 0,0002-1,00 | 0,00005 |
| Endrin | 72-20-8 | 0,003-0,020 | 0,003-1,00 | 0,001 |
| p,p' DDD | 72-54-8 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0003 |
| β endosulfan | 33213-65-9 | 0,0006-0,020 | 0,0006-1,00 | 0,0001 |
| p,p' DDT | 50-29-3 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |
| Endosulfan sulfato | 1031-07-8 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0002 |
| Metoxiclor | 72-43-5 | 0,001-0,020 | 0,001-1,00 | 0,0004 |

* El rango de trabajo está calculado considerando una dilución del extracto original hasta 50 veces. El rango puede ser ampliado si las características de la muestra lo permiten.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del cromatógrafo de gases HP6890 (INE 67)
- 2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16)
- 2.7. Ruta de análisis (RIN 39)
- 2.8. Ruta de registro de áreas de picos cromatográficos (RIN 40)
- 2.9. Ruta de preparación de estándares (RIN 35)
- 2.10. Instructivo de uso de la bomba de vacío Gast (INE 02)
- 2.11. Instructivo de uso de destilador Branstead (INE 36)
- 2.12. Instructivo de uso de desionizador Milli-Q (INE 28)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los plaguicidas organoclorados son extraídos de la matriz agua utilizando columnas de fase sólida (C18), previamente acondicionadas. Los plaguicidas retenidos son eluidos con una mezcla de hexano:éter etílico. El extracto es concentrado en baño de agua a 50 °C bajo corriente de N_2 .
- 3.2. La identificación de los plaguicidas organoclorados se realiza por comparación de los tiempos de retención de los diferentes compuestos, entre los cromatogramas de la muestra y de los estándares inyectados en la misma serie de análisis. Se utiliza un cromatógrafo de gases con detector de micro captura electrónica (GC/ μECD).
- 3.3. La confirmación se realiza utilizando una segunda columna de distinta polaridad, y condiciones similares de los demás parámetros cromatográficos.

3.4. La cuantificación de cada plaguicida organoclorado se realiza por interpolación del área normalizada (área plaguicida/área estándar interno) en la curva de calibración correspondiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes y lentes para la manipulación de la muestra.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Todos los reactivos se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

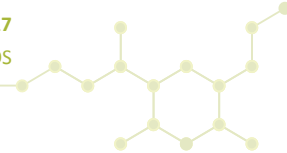
- 5.1. Otros compuestos extraídos de la muestra que posean en su estructura átomos electronegativos (halógenos, oxígeno, nitrógeno, azufre) son detectados por el detector de captura electrónica y pueden coincidir total o parcialmente con las señales de interés.
- 5.2. Ésteres de ftalatos: se debe evitar la utilización de materiales plásticos ya que los ftalatos son usados frecuentemente como plastificantes y son fácilmente extraídos durante el procesamiento de la muestra. Éstos interfieren en la determinación analítica.
- 5.3. Restos de jabón (dodecil sulfato de sodio): genera un pH básico en la superficie del material de vidrio, el cual puede degradar parcialmente algunos analitos (especialmente aldrin y heptaclor).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en botella de 1 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona, con contratapa de teflón enjuagada con acetona (o papel aluminio).
- 6.2. Preservar las muestras a ≤ 6 °C (> 0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días para la extracción y 40 días para la determinación.

7. INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- 7.1. Tubos de vidrio Pyrex de 50 mL.
- 7.2. Cromatógrafo de gases marca HP, modelo 6890, equipado con:
 - Columna cromatográfica BPX5 (5 % fenilo), 60 m; 0,25 mm id; 0,25 μ m film o similar
 - Columna cromatográfica BPX50 (50 % fenilo), 60 m; 0,25 mm id; 0,25 μ m film o similar
 - Detector de micro captura electrónica (μ ECD)
 - Inyector split/splitlessEn caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones aquí establecidas.
- 7.3. Balanza de de resolución 0,001 g (INE 06)
- 7.4. Balanza de resolución 0,00001 g (INE 07 ó INE 93)
- 7.5. Matraces aforados de 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; y 100,00 mL
- 7.6. Baño de agua, marca Büchi (IN 189)
- 7.7. Pipetas Pasteur de vidrio.
- 7.8. Viales de vidrio de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.
- 7.9. Jeringas de vidrio de 10, 50, 250 y 1000 μ L.
- 7.10. Equipo de extracción para columnas de extracción en fase sólida, Sep-Pak, marca Waters, cañerías y canillas de teflón.
- 7.11. Bomba de vacío marca Gast-Motor GM (IN 247) o similar
- 7.12. Bloque calefactor para la concentración de muestras con corriente de nitrógeno (IN 415)



8. REACTIVOS

- 8.1. Hexano grado plaguicida $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ Nro. CAS 110-54-3 (marca Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.2. Acetona grado plaguicida $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.3. Éter etílico grado plaguicida $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ Nro. CAS 60-29-7 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.4. Metanol para cromatografía (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.5. Isooctano grado plaguicida $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ Nro. CAS 540-84-1 (Baker, Mallinckrodt o similar)
- 8.6. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)
- 8.7. Columnas de fase sólida (SPE) C18 (Supelco o similar)
- 8.8. Estándares de: Aldrin ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6$ Nro. CAS 309-00-2), Dieldrin ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$ Nro. CAS 60-57-1), Heptaclor ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_7\text{O}$ Nro. CAS 1024-57-3), Lindano (γ -hexaclorociclohexano Nro. CAS 58-89-9), Metoxiclor ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_3\text{O}_2$ Nro. CAS 72-43-5), α endosulfan ($\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_3\text{S}$ Nro. CAS 959-98-8), β endosulfan ($\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_3\text{S}$ Nro. CAS 33213-65-9), Endosulfan sulfato ($\text{C}_9\text{H}_6\text{Cl}_6\text{O}_4\text{S}$ Nro. CAS 1031-07-8), p,p' DDE (Nro. CAS 72-55-9), p,p' DDD (Nro. CAS 72-54-8) y p,p' DDT (Nro. CAS 50-29-3), Endrin ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$ Nro. CAS 72-20-8), heptacloro epóxido (isómero B $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_7\text{O}$ Nro. CAS 1024-57-3).

8.8.1. **Solución stock de cada plaguicida** (concentración aproximada 100 mg/L): realizar una toma del estándar 8.8 correspondiente, en un matraz aforado, y llevar a volumen con isooctano. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Almacenar en freezer, vigencia 12 meses.

Nota 1: en caso de estándares sólidos, utilizar la balanza 7.4 para realizar la toma. Para soluciones estándares, realizar la toma con jeringa 7.9.

8.8.2. **Solución stock mix de plaguicidas** (concentración aproximada de cada plaguicida 1 mg/L): tomar con jeringa 7.9 1 mL de cada solución stock individual en un matraz aforado de 100 mL. Llevar a volumen con isooctano. Almacenar en freezer, vigencia 12 meses.

Nota 2: en caso de ser posible, utilizar como solución stock mix de plaguicidas un material de referencia certificado (MRC) que contenga los plaguicidas en estudio y realizar, a partir de este MRC, las diluciones para la curva de calibración.

8.8.3. **Solución de fortificación de plaguicidas** (concentración aproximada de cada plaguicida 0,2 mg/L): en un matraz aforado 5 mL, agregar 1 mL de la solución 8.8.2 y llevar a volumen con acetona. Almacenar en freezer, vigencia 6 meses.

8.9. **Solución estándar para control de veracidad de la determinación:** mezcla comercial de los plaguicidas analizados, de concentración conocida. Si es posible, utilizar un material de referencia certificado.

8.10. **Estándar interno:** estándar de decaclorobifenilo ($\text{C}_{12}\text{Cl}_{10}$ Nro. CAS 2051-44-3), pureza 99,9 %, marca Supelco o similar.

8.10.1. **Solución estándar stock de decaclorobifenilo:** (concentración aproximada 100 mg/L): realizar una toma de aproximadamente 10 mg del estándar 8.8 y llevar a 100 mL con isooctano. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Almacenar en freezer, vigencia 12 meses.

8.10.2. **Solución estándar de trabajo de decaclorobifenilo:** Diluir con isooctano hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/L. Registrar la toma y el volumen final en el RIN 35. Almacenar en freezer, vigencia 12 meses.

8.11. **Mezcla de elución:** preparar una mezcla hexano:éter etílico 95:5. Preparar un volumen mínimo de 500 mL.

8.12. Nitrógeno alta pureza (5.0 o 99,999%)

8.13. Nitrógeno (pureza 99,9%)

Nota 3: Reactivos para análisis (PA) son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Evitar contaminación cruzada de la muestras durante la manipulación.
- 9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para la etapa de extracción y purificación debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de plaguicidas. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.
- 9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

Puntos críticos en el análisis de muestras

- 9.4. Verificar que en la etapa de pasaje de la muestra por la columna SPE, la totalidad del sedimento remanente sea trasvasado, enjuagando sucesivas veces con agua las paredes y fondo del frasco.
- 9.5. El proceso de secado de las columnas SPE luego de la extracción es muy importante; esto se logra, dejando bajo vacío durante 2 horas, luego de verificar que esta pasando aire por la columna.
- 9.6. Es muy importante evitar evaporar a sequedad, en el proceso de concentración de las muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar como mínimo cinco soluciones estándares de la mezcla de plaguicidas, haciendo diluciones seriadas del estándar 8.8.2, en isooctano, de manera de cubrir todo el rango de trabajo. Si se cuenta con un material de referencia certificado de la mezcla de plaguicidas en estudio, realizar diluciones seriadas de dicho estándar cubriendo todo el rango de trabajo. Registrar la preparación de los estándares en el RIN 35. La vigencia de las diluciones es de 6 meses (conservar en freezer).
- 10.2. Realizar una toma de 1 mL con jeringa de cada solución estándar y pasar a un vial de 2 mL con tapa rosca. Agregar solución 8.10.2 en cada vial en una relación de 20 µL/mL. Luego de su utilización, sustituir el septo para evitar concentración y contaminación. Conservar estos viales en freezer. Vigencia de estos estándares 1 mes.
- 10.3. Analizar las soluciones estándares y determinar la curva de calibración para cada plaguicida, según 12.2.

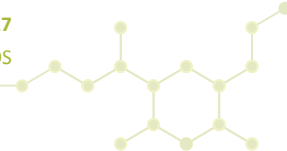
11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Acondicionamiento de las columnas SPE

- 11.1. En un soporte apropiado colocar las columnas a acondicionar junto con sus correspondientes canillas de teflón.
- 11.2. Agregar los siguientes solventes en orden sucesivo teniendo la precaución de no dejar secar la fase sólida entre agregados: hexano 6 mL, acetona 6 mL, metanol 12 mL y agua desionizada 12 mL. Luego de finalizado el acondicionamiento es necesario dejar un remanente de aproximadamente 5 mL de agua desionizada en la columna. La columna queda pronta para proceder con la extracción.

Toma de muestra y extracción

- 11.3. Homogeneizar la muestra.
- 11.4. Realizar una toma de aproximadamente 500 mL registrando el peso en el RIN 39; esta toma debe realizarse en un recipiente de vidrio (previamente lavado y enjuagado con solvente) utilizando la balanza 7.3.
- 11.5. Colocar las columnas SPE previamente acondicionadas en el equipo de extracción, manteniendo las canillas de teflón cerradas.
- 11.6. Conectar la bomba de vacío al equipo de extracción, intercalando en la cañería una trampa de seguridad para evitar el ingreso de muestra a la bomba.
- 11.7. Conectar las cañerías de teflón a las columnas SPE teniendo la precaución de que estas contengan agua suficiente de manera que al comenzar el proceso de succión no se seque la fase sólida. El extremo libre se coloca en el frasco que contiene la muestra; esta cañería debe quedar tocando el fondo del recipiente.
- 11.8. Encender la bomba de vacío y posteriormente abrir las canillas de las columnas de manera de lograr un goteo continuo de aproximadamente 15 mL por minuto. Verificar la hermeticidad de las columnas, marcando el nivel de muestra en la columna y controlando que este no varía con el tiempo.



- 11.9. Finalizado el pasaje de toda la muestra es necesario enjuagar con agua varias veces (3) el frasco contenedor, asegurándose que todo el sedimento contenido en la muestra ingrese a la columna SPE. Este es un paso fundamental para lograr buenas recuperaciones.
- 11.10. En este punto se inicia el proceso de secado de las columnas. Con la misma configuración del equipo se deja aproximadamente 2 horas en vacío, verificando el pasaje de aire a través de las columnas. Este es un paso fundamental para lograr buenas recuperaciones.
- 11.11. Colocar las columnas SPE secas en un soporte apropiado para su elusión.
- 11.12. Realizar sucesivos agregados de la mezcla de elusión a la columna hasta recoger aproximadamente 30 mL de eluato (en tubo Pyrex, de 50 mL). En caso que se dificulte la elusión por gravedad, se podrá facilitar la misma ejerciendo presión sobre la columna.
- 11.13. Concentrar el eluato en baño de agua a 50 °C bajo corriente de N₂ (8.13) hasta un volumen final de 0,5 mL. Es muy importante evitar que el extracto llegue a sequedad.
- 11.14. Medir el volumen final con jeringa 7.9, teniendo la precaución de tomar cuantitativamente el contenido del tubo (en caso de que se esté por encima de los 0,5 mL concentrar manualmente con N₂; en el caso que se esté por debajo, completar los 0,5 mL con hexano).
- 11.15. Agregar solución 8.10.2 (IS) en una relación de 20 µL/mL e inyectar en el cromatógrafo de gases.

Análisis cromatográfico

- 11.16. Prender el cromatógrafo de gases HP6890, según INE 67. Seleccionar el método OCL275 y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

* Inyector:
(verificar que el liner no tenga lana de vidrio para evitar la degradación en el inyector)

- Temperatura: 280 °C
- Modo de inyección: splitless, con apertura de split a los 0,20 min, flujo a 10 mL/min
- Condiciones del inyector automático:

| Washes | Pre injection | Post injection |
|-----------|---------------|----------------|
| Sample | 0 | --- |
| Solvent A | 2 | 0 |
| Solvent B | 3 | 2 |
| Pumps | 4 | --- |

* Inyector:

- FAST plunger
- Volumen inyección: 1 µL

* Horno:

- Temperatura inicial: 200 °C, mantener por 1 minuto
- Rampa 2.75 °C/min hasta 280 °C, mantener por 10 min
- Post-run: 0 minutos
- Tiempo total de corrida: 40,1 minutos

* Columna:

- BPX5 (SGE) 5 % fenilo, 60 m; 0,25 µm id; 0,25 µm film
- Carrier: N₂, 1,4 mL/min

* Detector µECD:

- Temperatura: 290 °C
- Make-up: N₂ 58,6 mL/min

Para estas condiciones cromatográficas, el orden de elución es el siguiente:

| Compuesto | tR (min)* |
|---------------------|-----------|
| Lindano | 9,02 |
| Heptaclor | 11,34 |
| Aldrin | 12,84 |
| Heptacloro epóxido | 14,79 |
| α endosulfan | 16,41 |
| p,p' DDE | 17,18 |
| Dieldrin | 17,82 |
| Endrin | 19,03 |
| p,p' DDD | 19,60 |
| β endosulfan | 19,75 |
| p,p' DDT | 21,64 |
| Endosulfan sulfato | 21,82 |
| Metoxiclor | 24,82 |

*Los tiempos de retención pueden presentar pequeñas variaciones entre corrida y corrida debido a cambios menores en la sensibilidad del equipo; a la hora de identificación de los diferentes plaguicidas, se deben comparar los cromatogramas de las muestras con los cromatogramas de las soluciones estándares analizadas en la misma corrida cromatográfica (mismo día).

Nota 3: Las condiciones cromatográficas definidas anteriormente pueden ser modificadas en los caso que, cambie la sensibilidad del equipo o que, por características especiales de la matriz, sea necesario aumentar la resolución cromatográfica.

11.17. Método de confirmación

Sustituir la columna utilizada (BPX5) por una columna BPX50 (o de similares características). Seleccionar el método OCCONF y verificar que las condiciones del método sean las establecidas a continuación:

* Inyector:

- Temperatura: 280 °C
- Modo de inyección: splitless, con apertura de split a los 0,20 min, flujo a 10 mL/min
- Condiciones del inyector automático:

| Washes | Pre injection | Post injection |
|-----------|---------------|----------------|
| Sample | 0 | --- |
| Solvent A | 2 | 0 |
| Solvent B | 3 | 2 |
| Pumps | 4 | --- |

* Inyector

- FAST plunger
- Volumen inyección: 1 μ L

* Horno:

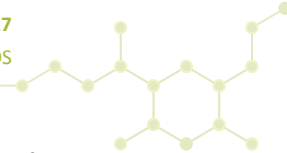
- Temperatura inicial: 200 °C, mantener por 1 minuto
- Rampa 2,75 °C/min hasta 275 °C, mantener por 25 min
- Post-run: 0 minutos
- Tiempo total de corrida: 53,27 minutos

* Columna:

- BPX50 (SGE) 50 % fenilo, 60 m; 0,25 μ m id; 0,25 μ m film
- Carrier: N₂, 1,4 mL/min

* Detector μ ECD:

- Temperatura: 290 °C
- Make-up: N₂ 58,6 mL/min



Identificar las señales a confirmar utilizando un estándar de la mezcla de organoclorados. Se confirman los plaguicidas detectados en el análisis inicial, cuando se observa una señal que coincide con el estándar correspondiente. Verificar cualitativamente que el área del plaguicida a confirmar es del orden del área obtenida en la determinación.

En caso de no disponer de una columna tipo BPX 50, se podrá utilizar otra columna de diferente polaridad, ajustando las condiciones cromatográficas de manera tal que sea posible resolver cromatográficamente todas las señales de los analitos de interés.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación utilizando el detector de captura electrónica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, su área normalizada por el área del estándar interno (IS), en función de la concentración. Para el rango de trabajo definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma $y = ax + b$, donde "y" es el área del plaguicida normalizada por el área del IS y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en $\mu\text{g/L}$.

12.2. Se comparan los cromatogramas de muestra y estándar para identificar coincidencias en las señales y en los casos afirmativos se registran las áreas correspondientes en el RIN 40.

12.3. La concentración de cada plaguicida en el **extracto** se calcula interpolando su área, normalizada por el área del estándar interno en el cromatograma de la muestra, en la curva de calibración correspondiente.

$$C_{\text{plaguicida } i'} \text{ extracto } (\mu\text{g/L}) = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida } i'} \text{ extracto} / \text{Área IS, extracto}) - b}{a}$$

siendo $i =$ Aldrin, Dieldrin, Heptaclor, γ -hexaclorobenceno (Lindano), Metoxiclor, α endosulfan, β endosulfan, Endosulfan sulfato, p,p' DDE, p,p' DDD y p,p' DDT, heptaclor epóxido y endrin.

12.4. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en $\mu\text{g/L}$, se calcula según:

$$C_{\text{plaguicida } i'} \text{ muestra } (\mu\text{g/L}) = \frac{C_{\text{plaguicida } i'} \text{ extracto} \times V \text{ final}}{T \text{ muestra}}$$

donde:

$C_{\text{plaguicida } i'} \text{ extracto}$: es la concentración de cada plaguicida, en $\mu\text{g/L}$, calculada según 12.3

$V \text{ final}$: volumen final del extracto, en mL.

$T \text{ muestra}$: toma de muestra, en g

Se asume que la densidad de las muestras es siempre 1 g/mL

12.5. Para aquellos organoclorados en los cuales las señales obtenidas sean mayores al límite de detección, es necesario realizar la confirmación cromatográfica por una segunda columna de distinta polaridad. Verificar cualitativamente que las concentraciones de los organoclorados confirmados sean comparables con los valores obtenidos en la etapa de cuantificación.

12.6. La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\% \text{ de recuperación}_{\text{plaguicida } i} = 100 \times \frac{(C_{\text{plaguicida } i'} \text{ M AD} - C_{\text{plaguicida } i'} \text{ M}) \times V \text{ final}}{[(V_{\text{Std Fort}} \times C_{\text{Std fort, plaguicida } i}) / V \text{ final}] \times T \text{ muestra}}$$

donde:

$C_{\text{plaguicida } i'} \text{ M AD}$: concentración de cada plaguicida en la muestra adicionada, en $\mu\text{g/L}$, calculada según 12.4

$C_{\text{plaguicida } i'} \text{ M}$: concentración de cada plaguicida en la muestra sólida sin adicionar, en $\mu\text{g/L}$

$V_{\text{Std Fort}}$: volumen de estándar de fortificación 8.8.3 adicionado a la muestra, en μL

$C_{\text{Std fort}}$: concentración del estándar de fortificación 8.8.3

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de la sensibilidad del equipo:

Junto con cada batch de muestras se inyectará al menos un punto de la curva de calibración. Se comparan las señales de los organoclorados (áreas normalizadas) de la solución estándar contra las señales obtenidas para ese mismo punto de la curva en la calibración mensual correspondiente (ver 11.3)

En caso de obtener una diferencia de señal mayor al 20 % con respecto a la curva de referencia, evaluar la pertinencia de analizar una nueva curva de calibración.

13.2. Control de veracidad de la determinación:

Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado a partir de 8.9 de concentración dentro del rango de calibración

La concentración obtenida para cada plaguicida debe estar en el rango 60-130% o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

13.3. Control de la exactitud del método:

Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea los analitos de interés. El contenido de dichos analitos debe estar en el rango 60-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. Control de precisión:

Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 5 muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 30%, para cada plaguicida.

13.5. Control de blancos:

En cada corrida, se analiza una blanco de reactivos, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que el cromatograma blanco no contenga señales que interfieran con los compuestos de interés.

13.6. Control de recuperación de fortificaciones:

Se debe realizar el análisis de un fortificado cada 5 muestras: de 1 L de muestra, tomar dos alícuotas de 500 mL y a una de ellas fortificarla con la solución 8.8.3 de tal forma que la concentración final esté dentro del rango lineal. Analizar la muestra y la muestra fortificada y calcular la recuperación de la adición según 12.5., la cual debe estar dentro del rango 60-130 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 8081B Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography, Revision 2, November 2000.

14.2. EPA Method 3535A Solid-Phase Extraction (SPE), Revision 0, December 1996.

14.3. EPA Chapter 4 Organic Analytes.

