



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARINAS Y COSTERAS
José Benito Vives De Andrés –INVEMAR
Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Programa CALIDAD AMBIENTAL MARINA – CAM

MANUAL DE TÉCNICAS
ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS
Y CONTAMINANTES MARINOS
(AGUAS, SEDIMENTOS Y ORGANISMOS)

PRESENTACIÓN

El progreso al que nos vemos abocados hoy, ha traído consigo cambios en el aspecto de este planeta y efectos ambientales de diversas dimensiones y Colombia no ha sido ajena a esta realidad. Muchas de las actividades que hacemos a diario deterioran los recursos y son quizás, los ecosistemas marinos, los más afectados.

Las ciudades costeras vierten a nuestros mares desechos y aguas residuales, las industrias aportan materia orgánica, y sustancias como hidrocarburos y metales pesados y por los ríos escurren tóxicos, producto de la actividad agrícola. Ahora nos vemos forzados a investigar las consecuencias ambientales de tales acciones: *“es necesario monitorear y evaluar nuestro entorno”*.

El diseño del proyecto REDCAM, (Red de Vigilancia de la Calidad Ambiental Marina), ha buscado tal fin; tomar, recopilar, sistematizar y analizar información sobre la calidad de las aguas marinas y costeras, considerando una serie de variables fisicoquímicas y contaminantes, las cuales permiten llegar a conclusiones y presentar o no alertas a la comunidad. De manera organizacional esta RED la conforman 16 nodos (CAR costeras, DAMA e institutos), enlazados a un servidor central en el INVEMAR, Santa Marta, muchos de ellos generadores de información primaria proveniente de sus laboratorios.

Por esta razón, la multiplicidad de entidades y técnicas analíticas y en vista de la poca existencia de textos actualizados en español, que contribuyan al conocimiento y valoración del entorno marino-costero; han llevado al INVEMAR por medio del Programa de Calidad Ambiental Marina, ha generar este documento, para servir de instrucción no sólo al personal que desarrolla análisis rutinarios de muestras ambientales en los laboratorios del sistema REDCAM, sino, a otras instituciones, estudiantes y técnicos interesados en la investigación científica marina.

Capitán de Navío FRANCISCO A.ARIAS ISAZA

Director General

INVEMAR

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
TÉCNICAS DE MUESTREO	13
1. Recolección de muestras	13
2. Recipientes para muestras	16
3. Preservación de muestras	18
Parámetros in situ	21
1. TEMPERATURA	21
2. pH	22
3. Salinidad	24
4. Transparencia	26
SÓLIDOS	29
1. Sólidos totales a 103 - 105°C	30
2. Sólidos totales en suspensión (seco a 103 – 105 °C)	32
3. Sólidos fijos y volátiles totales a 550°C	34



INVEMAR

Instituto de Investigaciones
Marinas y Costeras
"José Benito Vives De Andrés"
INVEMAR
Vinculado al Ministerio de
Ambiente, Vivienda y
Desarrollo Territorial

Director General
Capitán de Navío
Francisco A. Arias Isaza

**Subdirector Coordinación
de Investigaciones (SCI)**
Jesús Antonio Garay Tinoco

**Subdirector de Recursos
y Apoyo a la Investigación (SRAI)**
Carlos Augusto Pinilla González

**Coordinador Programa Biodiversidad
y Ecosistemas Marinos (BEM)**
Juan Manuel Díaz Merlano

**Coordinador (E) Programa
Valoración y Aprovechamiento
de Recursos Marinos (VAR)**
Roberto Federico Newmark U.

**Coordinador (E) Programa
Calidad Ambiental Marina (CAM)**
Jesús Antonio Garay Tinoco

**Coordinadora Programa de Investigación
para la Gestión en Zonas Costeras (GEZ)**
Paula Cristina Sierra Correa

Dirección general y edición
Jesús Garay Tinoco. Químico, M.Sc.
Gustavo Ramírez T. Químico, M.Sc.
Julián M. Betancourt P. Ing. Químico, Esp.

Participantes
Bienvenido Marín S. Químico, Dr.rer.nat.
Betty Cadavid. Química Farmacéutica,
Cand. M.Sc.
Lorenzo Panizzo D. Químico, M.Sc.
Luis Lesmes. Químico, M.Sc.
Jorge E. Sanchez S. Ing. Químico
Harold Lozano. Químico
Andrés Franco. Biólogo Marino, Cand. M.Sc.

Diseño y diagramación
Ed. Precolombi - David Reyes

Impreso por
Cargraphics - Impresión Digital

Santa Marta, DTCH – Julio de 2003
www.invemar.org.co

4. Sólidos sedimentables	35
5. Sólidos disueltos totales a 180 °C	37
 NUTRIENTES MARINOS	 39
1. Determinación de amonio (método del azul de indofenol)	40
2. Determinación de nitritos	43
3. Determinación de nitrato (reducción con Cd)	46
4. Determinación de nitrato por espectrometría ultravioleta	50
5. Determinación del fósforo reactivo	53
6. Determinación de silicato (método del metol)	56
7. Determinación de silicato (método de Koroleff)	59
8. Determinación del nitrógeno total (NTK).....	62
9. Determinación del fósforo total	66
 OXÍGENO DISUELTO Y CLOROFILAS	 71
1. Determinación de oxígeno disuelto (método Winkler) .	71
2. Determinación de clorofilas (método Stricklan y Parson)	75
3. Determinación de clorofila “a” y feopigmentos (método de Lorenzen)	77
4. Determinación fluorométrica de clorofila “a” y feopigmentos	79

CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA	83
1. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBOn)	84
2. Determinación de la materia orgánica en agua de mar por oxidación con permanganato en medio alcalino	87
3. Demanda química de oxígeno (DQO)	91
4. Materia orgánica en suelos y sedimentos, método de oxidación con dicromato (BS 1377:1975)	95
COMPUESTOS TÓXICOS QUÍMICOS	99
1. Hidrocarburos disueltos y dispersos en aguas (CARIPOL, 1980)	99
2. Determinación de hidrocarburos en sedimentos y organismos marinos (UNESCO/IOCARIBE, 1986).....	105
3. Determinación de plaguicidas organoclorados en aguas (método EPA, 1980)	111
4. Determinación de plaguicidas organoclorados en sedimentos (metodo EPA, 1980)	117
5. Determinación de plaguicidas organoclorados en organismos (método EPA, 1980)	121
6. Determinación de plaguicidas organoclorados (métodos referencia unesco, 1996)	124
7. Determinación de metales en aguas (EPA, 1980)	127
8. Determinación de metales en sedimentos	132
9. Determinación de metales en organismos	135

ANEXOS.....	139
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

INTRODUCCIÓN

Dentro del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, “José Benito Vives de Andrés”-INVEMAR, el Programa de Calidad Ambiental Marina-CAM, es uno de los más recientes, pero quizás también el de mayor proyección a nivel nacional. Esta proyección se ha logrado, gracias entre otros a la ejecución del proyecto “*Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia*”-REDCAM, el cual se inició en Diciembre de 2000 y con el tiempo se convirtió en una actividad permanente del Instituto, consolidándose como el de mayor impacto dentro de los ejecutados en los últimos cinco años al interior del Sistema Nacional Ambiental-SINA.

REDCAM es un sistema diseñado para la toma, recopilación, sistematización y análisis de información sobre la calidad de las aguas marinas y costeras, conformado por 16 nodos (CAR costeras, DAMA e Institutos), enlazados a una sede central en el INVEMAR, Santa Marta. En todos los nodos se genera información secundaria y en algunos, información primaria relacionada con niveles y valores de parámetros ambientales, pues cuentan con sus propios laboratorios para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos en las aguas de su jurisdicción.

Una parte importante de las conclusiones emanadas del trabajo científico y éxito de REDCAM se fundamenta en la calidad analítica de los resultados; por consiguiente, la trazabilidad en la obtención de la información es fundamental. La multiplicidad de organizaciones involucradas en este proyecto, y el hecho de que para la evaluación de estos parámetros se disponga de numerosas técnicas que usualmente están basadas en los mismos principios, hace necesario realizar procesos de estandarización y/o modificaciones para así cumplir con los requisitos de selectividad, sensibilidad y precisión fijados en las normas internacionales.

En desarrollo de estos estudios se consideran una serie de variables, las cuales permiten llegar a conclusiones y presentar o no alertas a la comunidad. Por esta razón y confiando en desarrollar una función con un alto grado de aseguramiento de calidad, el Programa Calidad Ambiental Marina, ha generado este documento, para servir de instrucción no sólo al personal que desarrolla análisis rutinarios de muestras ambientales en los laboratorios del INVEMAR, las CAR, los DAMA y los institutos del SINA, sino a otras instituciones que desarrollan investigación científica marina.

Si bien existen documentos como el *Standard Methods* y normas como las *American Society for*

Testing & Materials (ASTM), *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) o UNESCO, expedidas por organismos internacionales muy reconocidos en asuntos ambientales, en este manual se retoman pero con modificaciones hechas para las condiciones físicas y tecnológicas con que cuentan los laboratorios del país. Se han adaptado siguiendo principalmente las recomendaciones de Strickland y Parsons para el análisis fisicoquímico de aguas, así como los métodos de referencia para el estudio de la contaminación marina documentados por UNESCO, *United Nations Environment Programme* (UNEP), *Intergovernmental Oceanographic Comisión* (IOC), *International Atomic Energy Agency* (IAEA) y CARIPOL/IOCARIBE.

Parte de las técnicas recopiladas en el presente documento fueron tomadas del Manual de Técnicas Analíticas de Parámetros Físico-Químicos y Contaminantes Marinos, publicado por el CIOH (Garay, *et al*, 1993), por lo cual se convierte en una versión actualizada y aumentada de la tercera edición de dicho manual.

Este manual pretende apoyar a las instituciones nacionales e internacionales que trabajan en asuntos marinos, suministrando una herramienta, que les permita estandarizar sus procedimientos y protocolos para garantizar resultados y datos confiables y seguros, y a la vez, realizar ejercicios de intercomparación con los demás laboratorios a nivel nacional e internacional.

Para quien es este libro

Este libro esta pensado para ser usado como texto de consulta y guía didáctica por el personal que realiza análisis ambientales en el país, en especial a las entidades que desarrollan estudios en zonas costeras y aguas marinas, las CAR costeras y los institutos de investigaciones marinas, pero esto no priva a estudiantes y técnicos que puedan acceder a su consulta.

El manual presenta un esquema muy general, inicia con una breve introducción en la cual se expone el alcance y la aplicación de cada método, luego se listan los materiales, equipos y reactivos que son indispensables para la ejecución, además de una descripción en forma de pasos y de diagrama de flujo sobre el procedimiento y algunas recomendaciones. Finalmente las ecuaciones y los cálculos que son necesarios para cuantificar el parámetro analizado. Si bien es cierto, que no profundiza en el desarrollo teórico y científico de cada técnica, esta razón lo hace accesible a un mayor número de personas, que apenas se inician en el campo de la química ambiental.

Los lectores ya sean administradores de laboratorios ambientales, técnicos o estudiantes que se inician en este campo lo encontrarán bastante práctico y didáctico, con ilustraciones y diagramas de flujo que harán más fácil la memorización, ejecución y supervisión de las técnicas en el laboratorio.

Gustavo Ramírez Triana, Msc.

Coordinador Unidad de Laboratorios-ULAB
Programa Calidad Ambiental Marina-CAM
INVEMAR

TÉCNICAS DE MUESTREO

1. Recolección de muestras

1.1 Aguas

Las técnicas de muestreo varían de acuerdo con la situación específica y según los objetivos previstos; algunos estudios requieren solamente muestras instantáneas o simples, mientras que en otros se necesita disponer de muestras compuestas o aún más elaboradas en tiempo y espacio. Muchas de las generalidades referentes a las técnicas de muestreo y conservación, se encuentran plasmadas en las Normas Técnicas NTC-ISO 5667-2 y 5667-3.

1.1.1 Tipos de muestras

- Muestras sencillas y compuestas: En los estudios de caracterización fisicoquímica de aguas naturales generalmente se necesita recolectar muestras sencillas, mientras que para vertimientos domésticos e industriales se aplican muestras compuestas debido a la variación horaria de su caudal, por tal razón son muy utilizadas en el monitoreo de ríos, vertimientos o procesos industriales en línea. Para su adquisición se recolectan muestras parciales cada 2 ó 3 horas, cuyo volumen se obtiene según la siguiente relación:

$$V_p = Q_p \times \frac{V_c}{N \times Q}$$

V_p : Volumen de cada muestra parcial (ml)

V_c : Volumen de muestra compuesta (ml)

Q_p : Caudal parcial del agua ($m \text{ seg}^{-1}$)

Q : Caudal promedio ($m \text{ seg}^{-1}$)

N : Número de muestras parciales

En algunos estudios de calidad ambiental marina es necesario el monitoreo de afluentes con el fin de conocer las descargas y el volumen de contaminantes que llegan al mar, por tal motivo es necesario realizar muestreos compuestos para lograr la correcta caracterización de dichos afluentes (que pueden ser ríos o descargas de aguas residuales).

- *Muestras periódicas (o discontinuas)*: Cuando se realiza la toma a intervalos de tiempo constantes, se obtienen muestras de iguales volúmenes, o bien de volúmenes diferentes, siendo el volumen dependiente del flujo.
- *Muestras continuas*: La recolección se hace en forma continua y la velocidad de flujo con que se toma puede ser fija o variable dependiendo de si existe o no variación en el caudal del cuerpo de agua que se estudia (también puede ser un vertimiento).

Las muestras periódicas y/o continuas son muy utilizadas en el monitoreo de ríos, vertimientos o procesos en línea para la industria.

- *Muestras en serie:*
 - De perfil profundo: muy aplicables en oceanografía cuando el objetivo es conocer la variación vertical de un parámetro, por ejemplo, definir la posición de la capa termohalina, de la picnoclina, etc.
 - De perfil de área: serie de muestras de agua tomadas a una profundidad en particular, de una masa de agua en diversas locaciones; muy utilizadas para definir distribuciones espaciales por capas.

1.1.2 Equipos de Muestreo

Cuando las muestras son superficiales únicamente es necesario extremar la limpieza del material y procurar procedimientos que eviten la contaminación. En muestras superficiales la recolección se puede hacer manualmente introduciendo la botella colectora bajo la superficie, procurando siempre hacerlo a la misma profundidad (c.a. 25 cm).

Cuando el objetivo es obtener muestras de agua a profundidades determinadas, se emplean botellas colectoras dotadas de mecanismos de cierre para confinar la masa de agua que se encuentra a la profundidad de interés. En estudios oceanográficos, se emplean normalmente botellas Nansen para el análisis de los parámetros fisicoquímicos, pH, salinidad, oxígeno disuelto y nutrientes inorgánicos. Las botellas Van Dorn y Niskin, por tener capacidad de mayor volumen, son ideales para la obtención de muestras en el análisis de pigmentos fotosintéticos y contaminantes (pesticidas, metales pesados, etc).

Hay que tener bastante precaución cuando se usan estas botellas en el muestreo de aguas con alto contenido de sólidos sedimentables; su forma alargada y un flujo muy lento para extraer la muestra por las llaves, facilitan la sedimentación de los sólidos provocando diferencia en este parámetro entre las primeras y las últimas botellas receptoras que se llenan.

La botella Van Dorn horizontal es adecuada para coleccionar muestras de fondo en cuerpos de agua muy someros, siendo muy apropiada para estudios de estratificación vertical, termoclinas y termohalinas en lagunas costeras, mientras que las de funcionamiento vertical permiten coleccionar muestras a mayores profundidades.

La recolección de muestras para el análisis de hidrocarburos requiere un equipo de muestreo especial; la muestra se debe recolectar en la misma botella de almacenamiento (que debe ser de vidrio) y a una profundidad de un metro, por lo cual no es posible utilizar ninguna de las mencionadas anteriormente.

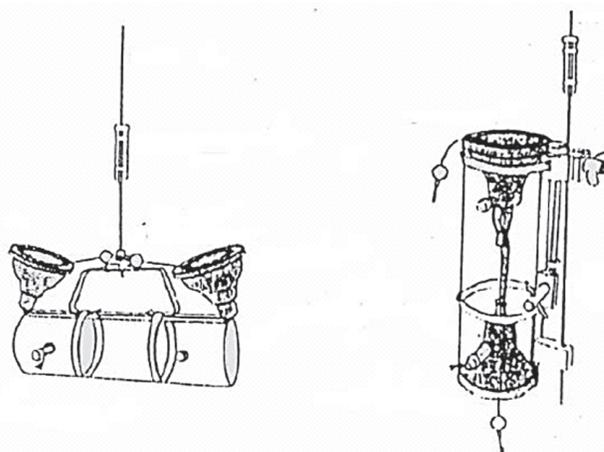
En la siguiente tabla se detallan las botellas de muestreo más utilizadas en los estudios de calidad de agua, conjuntamente con sus especificaciones y aplicaciones más generales.

Tabla 1. Equipos utilizados para el muestreo de aguas¹

Equipo	Aplicación	Material de construcción y de contacto con la muestra	Ventajas	Desventajas
Botella Nansen	Colecta de fitoplancton	Metal/ recubierto con capa de teflón	Se puede usar en serie	Colecta poco volumen de muestra
Botella Kemmerer	Compuestos químicos (*)	PVC	No genera contaminación metálica	Capacidad fija, existen de 0,4 a 15 litros
	Bacteriología	Latón / bronce		Toxicidad debido al metal
	Zooplancton	Acrílico / plástico	No contamina con metales	
Botellas Van Dorn	Compuestos químicos (*) Bacteriología Fitoplancton Zooplancton	PVC	No generan contaminación metálica	Capacidad fija, existen de 2 a 30 litros
Botellas comunes	Compuestos químicos (*) y Bacteriología	Vidrio	Bajo costo	No puede controlarse la profundidad del muestreo
Bombas extractoras	Compuestos químicos (*) Fitoplancton Zooplancton	Acero inoxidable	Puede coleccionar grandes volúmenes en forma continua, muestrea la columna en sentido vertical	Existe la posibilidad de contaminación metálica y puede generar daño a los microorganismos

(*) Los compuestos contaminantes tipo plaguicidas, tóxicos metálicos y orgánicos prioritarios deben ser colectados con muestreadores que posean materiales de contacto tales como teflón, vidrio u otros que no contaminen la muestra.

En las siguientes figuras se ilustran las botellas tipo Van Dorn, que son las más utilizadas para recolectar aguas superficiales continentales y marinas, destinadas a análisis químico, biológico y bacteriológico.



Botellas de muestreo tipo Van Dorn

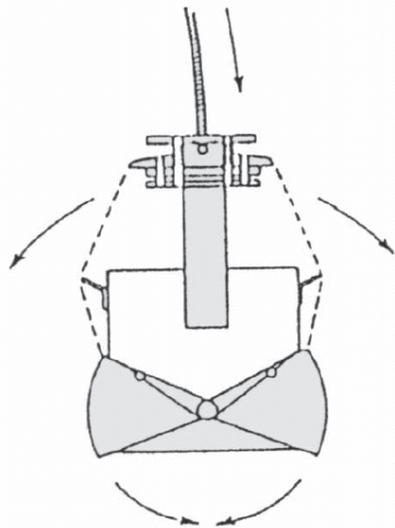
¹ Tomado de US. EPA. 1982. Handbook for Sampling and Sample Preservation of Water and Wastewater

El volumen de muestra de agua a coleccionar depende de los requerimientos del laboratorio con base en la cantidad de parámetros a analizar: Para el análisis de compuestos orgánicos se deben utilizar filtros de fibra de vidrio (p.ej. Whatman GF/C), aceptándose por convención que el material retenido en el filtro es la fracción particulada o suspendida, mientras que el filtrado constituye la fracción disuelta.

1.2 Sedimentos marinos y costeros

1.2.1 Equipos de muestreo

- Dragas: Para la extracción de sedimentos existen dragas con características de diseño muy variadas que incluyen modalidades de cierre de mordaza, activadas mediante resorte o el peso de la misma draga. La draga para muestreo de sedimentos más popular es la de tipo Eckman, ilustrada en la figura siguiente.



Draga para la recolección de sedimento tipo Eckman

Algunos implementos menos elaborados como los corazonadores y el cono siguen siendo muy utilizados por su bajo costo y facilidad de operación.

- Corazonadores: Se utilizan en estudios cuando la información relacionada con el perfil vertical de un sedimento es de interés. Salvo que la muestra obtenida tenga resistencia mecánica, se debe tener cuidado al retirarla del núcleo, con el fin de preservar su integridad longitudinal. Se puede recurrir a congelar el núcleo para facilitar tal labor, siempre y cuando no altere la composición.

Para muestras superficiales y de terreno, la utilización de cucharas plásticas o de acero inoxidable es suficiente. En estudios de metales pesados no se deben utilizar equipos construidos de metal, deben emplearse cucharas o corazonadores plásticos (por lo general de PVC).

2. Recipientes para muestras

La credibilidad de los datos generados por cada laboratorio depende en gran medida de la calidad y estado de las muestras que ingresan al mismo, siendo pertinente tomar todas las precauciones necesarias para evitar su mínimo deterioro a partir del momento de su recolección. Los parámetros de calidad del agua que normalmente se analizan se pueden dividir en los siguientes tres grupos, de acuerdo con su mayor o menor susceptibilidad de alteración.

- Conservativos. (Concentración no varía con el tiempo)
- No conservativos/preservables. (Concentración cambia con el tiempo, pero pueden ser estabilizados al menos por 24 horas)
- No conservativos. (Concentración varía rápidamente con el tiempo y no pueden ser preservados, como temperatura, pH y oxígeno disuelto).

El manejo de las muestras recolectadas en campo debe cumplir con las siguientes precauciones generales para evitar al mínimo su contaminación:

- Las medidas realizadas en campo se deben hacer en una submuestra separada, que se descarta luego de la determinación.
- Los recipientes para el envase de muestras, nuevo o usado, deben limpiarse siguiendo un protocolo de lavado establecido, utilizando el mismo recipiente para cada tipo de parámetro.
- Los recipientes de muestras se deben almacenar en ambientes limpios, libres de polvo y suciedad, debiéndose aplicar iguales precauciones durante su transporte del campo al laboratorio.
- Los derivados de petróleo (aceites, gases de escape y combustibles de lanchas y vehículos) son fuentes potenciales de contaminación de las muestras. Es sabido que el humo de cigarrillo y los gases de escape contaminan las muestras con plomo y metales pesados.
- NUNCA mida en campo o en el laboratorio la conductividad en una muestra de agua donde se haya medido previamente el pH, debido a que los electrodos de pH difunden KCl y alteran el valor medido. Esto es particularmente válido para muestras de agua dulce con niveles bajos de conductividad.
- No deben exponerse las muestras a la luz solar directa, por lo cual debe procurarse arribar lo más rápido al laboratorio.

En lo posible, es conveniente detectar los errores sistemáticos o al azar generados por una manipulación deficiente de las muestras y/o contaminación de los envases de muestreo, desde la toma hasta su determinación en laboratorio. Para lo anterior, antes de comenzar la recolección de las muestras se selecciona al azar uno de cada 10 frascos limpios para llenar con agua destilada, se preserva de la misma manera que las muestras y

se analiza con las mismas. El análisis permitirá detectar cualquier contaminación debida a los recipientes de muestreo utilizados.

La selección y preparación de un recipiente puede ser de gran importancia, más adelante en cada análisis se indicará el tipo de recipiente en el cual se debe recolectar y almacenar la muestra. En la Norma NTC-ISO 5667/2 se da orientación sobre el tema. No obstante, se debe recordar que el recipiente en el cual se almacena la muestra y el tapón no deben:

- Ser causa de contaminación (por ejemplo, los recipientes de vidrio de borosilicato pueden incrementar el contenido de sílice o sodio).
- Absorber o adsorber los constituyentes que se deban determinar (por ejemplo, en un recipiente de polietileno se pueden absorber hidrocarburos; y en la superficie de uno de vidrio se pueden adsorber trazas de metales).
- Reaccionar con ciertos constituyentes de la muestra (por ejemplo, fluoruros que reaccionen con el vidrio).

En el caso de muestras para la determinación de parámetros fisicoquímicos, una precaución sencilla que, sin embargo, no es adecuada en todos los casos*, es *llenar los frascos completamente y taparlos* en tal forma que no haya aire sobre la muestra. Esto limita la interacción con la fase gaseosa y la agitación durante el transporte evitando así, las modificaciones en el contenido de CO₂, y por consiguiente, las variaciones en el pH; los hidrocarbonatos no se convierten en carbonatos precipitables; el hierro tiene menos tendencia a ser oxidado, limitando así variaciones de color, etc.

* No se recomienda llenar completamente los frascos cuando las muestras van a ser sometidas a congelamiento, porque la dilatación puede provocar la ruptura del envase.

Si las muestras van a ser congeladas, los frascos se deben llenar, pero no completamente; el congelamiento (a -20°C) permite en general un incremento en el período de almacenamiento. No obstante, es necesario controlar la técnica de congelamiento y deshelado, para retornar la muestra a su equilibrio inicial; en este caso es muy recomendable usar recipientes plásticos.

3. Preservación de muestras

Las técnicas analíticas son válidas, es decir, cumplen con los requisitos de precisión y exactitud siempre y cuando sean aplicadas a muestras recientemente tomadas. En muchos casos los análisis no pueden ser realizados inmediatamente en el sitio de procedencia y se hace necesario un procedimiento de preservación de las mismas que garantice la conservación de los analitos durante el transporte al laboratorio y el tiempo necesario para ejecutar el análisis. Una buena técnica de preservación debe retardar los cambios químicos y biológicos que sufre la muestra una vez ha sido removida de su fuente.

Los diferentes procedimientos son establecidos teniendo en cuenta la naturaleza de la muestra, la estabilidad de los analitos, la reactividad de estos y la matriz donde se encuentran. Las funciones de los métodos de preservación son retardar la acción biológica y la hidrólisis de los compuestos químicos y sus complejos, reducir la volatilidad de los constituyentes y los efectos de absorción y retardar la oxidación y reducción de los componentes de interés. En general, los métodos existentes para la preservación se limitan a un control de pH, la adición de sustancias químicas, la refrigeración y la congelación de las muestras.

3.1 Aguas

Para la conservación de muestras líquidas se han propuesto diversos componentes químicos, a concentraciones variadas equitativamente. Los más utilizados son:

- Ácidos
- Soluciones básicas
- Biocidas
- Reacciones particulares (fijación)

En la tabla 2 se presentan las recomendaciones para preservación de muestras según el tipo de constituyente y parámetro a evaluar. Otro punto indirecto de importancia es minimizar la alteración que sufre la muestra una vez es tomada, por ello el contenedor debe evitar la contaminación, ayudar a la preservación de la muestra y protegerla de la acción de la luz.

En la Norma NTC-ISO 5667/3 y el *Standard Methods* se pueden encontrar más recomendaciones con respecto a la preservación y almacenamiento de muestras líquidas.

3.2 Sedimentos marinos

Cuando las muestras son de sedimentos, la mejor forma de almacenar y preservar la muestra es secándola; para esto el mejor procedimiento es la liofilización (secado a bajas temperaturas), y el almacenamiento en un medio exento de humedad. Si el análisis inmediato no es posible, y tampoco se cuenta con un equipo liofilizador, es conveniente secarla en estufa a 40°C hasta que la muestra esté libre de humedad. Posteriormente se almacena en bolsas plásticas, si el análisis es de metales pesados; o en papel aluminio, si se buscan residuos de pesticidas, asegurándose de mantenerlas en un desecador.

Cuando se quieren determinar en los sedimentos parámetros como materia orgánica, nitrógeno total o fósforo total, el congelamiento es suficiente.

Es aconsejable realizar una determinación simultánea de humedad para expresar los resultados en base seca.

Tabla 2. Recomendaciones para la preservación y almacenamiento de muestras líquidas²

Parámetro por estudiar	Tipo de recipiente	Técnica de preservación	Tiempo máximo de preservación recomendado antes del análisis
Temperatura	P, V	-	De inmediato
Salinidad	V, P sello hermético	De inmediato, o refrigerere sello hermético	6 meses
pH	P, V	-	Analice de inmediato
Sólidos	P, V	Refrigerar	7 días
Amonio	P	Congelar -20°C	7 días
Nitrito	P	Congelar -20°C	2 días
Nitrato	P	Congelar -20°C	48 horas
Silicatos	P	Congelar -20°C	28 días
Nitrógeno total	P, V	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH 2 y refrigerar	7 días
Fosfatos	P, V enjuagado con ácido	Filtrar y congelar	48 horas
Fósforo total	P, V	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH 2 y refrigerar	28 días
Oxígeno disuelto	V, botellas DBO	Titulación puede ser demorada después de la acidificación	8 horas
Clorofila	P, V	Filtradas, en la oscuridad a - 20°C	28 días
DBO	P, V	Refrigerar	6 horas
DQO	P, V	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH 2 y refrigerar	7 días
Pesticidas	V, enjuagado con solvente	Refrigerar, adicionar 50 ml de solvente	7 días
Metales	P, enjuagado con ácido	Adicionar HNO ₃ a pH 2 y refrigerar	6 meses
Hidrocarburos disueltos dispersos	V, enjuagado con solvente	Refrigerar, adicionar si es posible el solvente de extracción	Realizar la extracción al menor tiempo posible
Aceites y grasas	V de boca ancha, enjuagado con ácido	Adicionar H ₂ SO ₄ a pH 2 y refrigerar	28 días

P= Plástico, V =Vidrio

² Adaptada del *Standard Methods*. 20th Edition, y de la Norma NTC ISO-5667/3

PARÁMETROS *IN SITU*

1. Temperatura

Las lecturas de temperatura son usadas en operaciones generales de laboratorio. En estudios limnológicos, a menudo se requiere el conocimiento de este parámetro como una función de la profundidad. Además, las temperaturas elevadas que resultan de descargas de agua caliente pueden tener un impacto ecológico significativo.

Normalmente, las medidas pueden hacerse con un termómetro Celsius (centígrado) con columna de mercurio, el cual mínimo debe tener escala marcada cada 0.1°C . Para prevenir rupturas en labores de campo, se recomienda un termómetro con cazoleta protectora. En la actualidad se emplean muchos medidores electrónicos provistos con sondas, los cuales poseen termocuplas o termistores en su interior.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, efluentes industriales y domésticos. Su precisión viene dada por el equipo utilizado para la determinación; existen termómetros de mercurio que permiten mediciones con $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, y equipos electrónicos con sensores (termo-resistencias y termocuplas), que permiten precisión de $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$.

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La medición de temperatura en muestras ambientales debe ser una labor realizada *in situ*, y no aplica por ello los procedimientos de almacenamiento y preservación. El mejor método para la lectura de este parámetro es introducir directamente los equipos de medición (termómetro o sonda) en el cuerpo de agua.

1.2 Materiales y equipos

Termómetro de mercurio
Termómetro invertido
Sonda con sensor de temperatura

1.3 Procedimiento

Las muestras en campo deben medirse directamente en la columna de agua introduciendo la sonda y procurando mantenerla siempre a la misma profundidad (25 cm por debajo de la superficie).

Para tomar la temperatura en el fondo de la columna de agua es conveniente el uso de botellas que posean termómetros invertidos, o el uso de

sondas que puedan bajar hasta el lugar donde se necesita leer. Si no se dispone de estos materiales, se toma la muestra con una de las botellas de muestreo (Nansen o Niskin) y se transfiere la mayor cantidad de agua a un recipiente grande (balde, con el fin de minimizar los errores por la transferencia de calor con el ambiente), y se introduce la sonda o termómetro, se mantiene una agitación constante con movimientos circulares y se registra el valor de temperatura; esta operación debe hacerse lo más rápido posible.

1.4 Calibración

Con miras a los procesos de validación y certificación de los laboratorios ambientales, los termómetros y sensores de temperatura deben calibrarse al menos una vez al año por una institución competente, o contra termómetros certificados, siguiendo el protocolo para cada equipo y/o fabricante.

1.5 Bibliografía de consulta

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

2. pH

La medición del pH es uno de las actividades más importantes y de mayor frecuencia en las pruebas químicas del agua. El rango de pH para aguas naturales oscila entre 4 y 9 y la mayoría son ligeramente básicas debido a la presencia de bicarbonatos y carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos. El pH del agua pura a 25°C es de 7, neutro.

En la actualidad la técnica más exacta, usada para la medición del pH es la potenciométrica, que se fundamenta en la medida de la diferencia de potencial experimentada en dos celdas electroquímicas (denominadas electrodos), se emplea un electrodo combinado de membrana de vidrio y uno de calomel como referencia. Los equipos actuales combinan estas dos celdas electrolíticas en un mismo sensor, y poseen programas electrónicos internos que dan la medida directa a partir de la diferencia de potencial, facilitando la lectura de este parámetro. Los medidores de pH (pHmetro) modernos poseen un mecanismo electrónico que compensa automáticamente la medida con respecto a la temperatura, mostrando de esta forma el valor real de pH a la temperatura de medición.



Equipo pHmetro WTW. Utilizado para medir el pH en laboratorio y en campo

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, efluentes industriales y domésticos. Su precisión viene dada por el equipo utilizado para la determinación; existen pHmetros que permiten mediciones con +/- 0.001 unidades, y para su calibración requieren de cinco puntos o estándares. Los más utilizados dan una precisión de +/- 0.01

unidades, y se calibran con tres puntos (pH 4.00 , 7.00 y 10.00).

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La medición del pH en muestras ambientales también debe ser una labor realizada *in situ*. El mejor procedimiento para medir este parámetro es introducir el sensor en el cuerpo de agua; si esto no es posible (como para aguas profundas), se puede recolectar la muestra con una de las botellas de muestreo (Nansen o Niskin), transferirla luego a una botella de polietileno completamente llena (250 – 500 ml), taparla y almacenarla en la oscuridad y a baja temperatura hasta el momento de la lectura (WTW, 1997). Si la lectura no se puede realizar en el momento del muestreo se deben mantener las botellas en la oscuridad, evitando el intercambio con la atmósfera, sobre todo si se trata de aguas de alta pureza o que no estaban en equilibrio con esta.

El tiempo de almacenamiento está condicionado a lo que demore el transporte de la muestra desde el sitio de muestreo al laboratorio; este tiempo debe ser el menor posible tratando de no superar un par de horas.

2.2 Materiales y equipos

pH-metro
 Electrodo
 Beakers de 50 ml
 Unidad de agitación magnética
 Barras magnéticas de agitación, recubiertas con teflón
 Soporte metálico
 Agua destilada

Frasco lavador
 Beaker grande (1000 ml)

2.3 Reactivos

Soluciones Buffer, pH: 4.01, 7.00 y 10.01, de cualquier marca certificada disponible en el mercado.

2.4 Procedimiento

Muestras en laboratorio:

- Calibrar el equipo, tal como se describe en el numeral 2.5
- Enjuagar completamente el electrodo con agua destilada y luego con muestra
- Traspasar una buena cantidad de muestra (aprox. 50 ml) a un erlenmeyer previamente purgado
- Colocar una barra magnética y mantener agitación suave para lograr una medición más precisa
- Introducir el electrodo en la muestra
- Esperar a que estabilice la lectura en el display del equipo, aproximadamente 30 segundos, para registrar el pH de la muestra
- Sacar el electrodo y enjuagarlo con agua destilada y colocar su respectivo protector del bulbo.

Muestras en campo:

Las muestras en campo pueden medirse directamente en la columna de agua procurando mantener siempre la sonda a la misma profundidad (25 cm por debajo de la superficie). Las muestras extraídas del fondo de la columna, se transfieren de la botella de muestreo a un recipiente (beaker), se introduce la sonda, se mantiene una agitación

constante con movimientos circulares y se registra el valor del pH; esta operación debe hacerse lo más rápido posible.

2.5 Calibración

El equipo debe calibrarse diariamente antes de efectuar las mediciones, de la siguiente manera:

- Seleccionar dos buffers cuyo rango de pH comprenda el valor esperado del pH de la muestra; el primero debe ser cercano al punto isopotencial del electrodo (pH 7) y el segundo, al pH esperado de la muestra (por ejemplo pH 4 o pH 10)
- Enjuagar el electrodo con agua destilada y luego con solución buffer pH 7
- Colocar el electrodo en el frasco que contiene la solución buffer pH 7
- Introducir una barra magnética y mantener agitación suave
- Esperar por lo menos 30 segundos y proceder de acuerdo con el Manual de Operación del Equipo
- Repetir los cuatro últimos pasos, pero utilizando el segundo buffer y operar como se describe en el manual del equipo
- Si todas las etapas son realizadas perfectamente, el valor de la pendiente del equipo estará entre el 92 y 102% y se podrá proceder a la medición de pH.

Recomendaciones

Se debe determinar el pH de las aguas *in situ*, de modo que no se alteren los equilibrios iónicos debido al transporte o a una permanencia prolongada de las muestras en los frascos.

2.6 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

WTW - ORION. 1997. Manual de instrucciones. WTW pHmeter 330.

3. Salinidad

El conocimiento de la salinidad es fundamental en estudios oceanográficos, pues es necesario para la determinación de corrientes y la identificación de masas de aguas. En estudios ambientales es un factor importante porque puede significar la presencia o no de organismos y peces.

Martín Knudsen, en 1901, la definió como el número total de gramos de material sólido disuelto en un kilo de agua de mar. Cuando el carbonato ha sido convertido en óxido, el bromo y el yodo han sido reemplazados por cloro y toda la materia orgánica ha sido completamente oxidada, después de secar la muestra a una temperatura de 480°C (Margalef, 1982).

La salinidad se puede calcular a partir de la conductividad, el resultado es numéricamente menor que el residuo filtrable y se reporta usualmente como gramos por Kg o partes por mil (psu ó ‰).

La mayor parte de las sales disueltas en el agua de mar están en forma de halogenuros, que, a excepción del flúor, se determinan globalmente por argentimetría. La salinidad se puede determinar a

partir de la conductividad eléctrica, gravedad específica o con equipos tales como el salinómetro de inducción o el refractómetro; de todos, el menos preciso es este último.

Actualmente en la mayoría de laboratorios se mide por medio de la conductividad, la cual se define como la capacidad que tiene una sustancia de transportar electrones (conducir electricidad); en el agua, esta capacidad se ve influenciada por la cantidad de sales disueltas y la temperatura. Esto significa que a mayor contenido de sales, mayor conductividad; de esta forma, se puede emplear esta propiedad para medir el contenido de sales en una muestra de agua.

Hoy en día existen equipos que miden la conductividad y la temperatura de una muestra de agua, y calculan la salinidad a través de programas electrónicos internos. Si no se dispone de un equipo de estos, también se puede determinar con un conductímetro, un termómetro y haciendo uso del algoritmo reportado en "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*". La ecuación para la conductividad relativa a la temperatura t (Rt) puede ser tomada de "*Specific Conductance: Theoretical considerations and application to analytical quality control*" por R.L. Miller, W.L. Bradford, y N.E. Peters.

En los salinómetros de inducción se genera un campo eléctrico que induce una corriente eléctrica a través de una bobina por la que circula el fluido; esta corriente generada es proporcional a la salinidad de la muestra, De esta manera se emplea dicha propiedad para medir la concentración de sales disueltas en un líquido.

Alcance y aplicación

El método conductimétrico es aplicable a todo tipo de aguas naturales, especialmente de mar. Tam-

bién es aplicable a efluentes industriales y domésticos.

Su precisión viene dada por el equipo utilizado para la determinación, generalmente salinómetros - conductímetros, que permiten mediciones con $\pm 0.1\%$. Existen equipos como los salinómetros de inducción que tienen una precisión de $\pm 0.0003\%$.

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

De la botella Nansen o Niskin la muestra se pasa a una botella de polietileno de 500 ml previamente purgada y se tapa para prevenir la evaporación. La lectura se realiza una vez llegado al laboratorio, si no es posible en el mismo día, la muestra debe refrigerarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin sobrepasar los siete días de almacenamiento.

3.2 Materiales y equipos

Salinómetro –conductímetro o salinómetro de inducción
Beakers

3.3 Reactivos

Agua estándar de mar de $35\text{ }‰$
Soluciones de KCl

3.4 Procedimiento

Las muestras en campo pueden medirse directamente introduciendo la sonda en la columna de agua y procurando sumergirla siempre a la misma profundidad (25 cm por debajo de la superficie).

Para muestras extraídas del fondo de la columna, se transfiere de la botella de muestreo a una botella de polietileno; en el momento de realizar la lectura se introduce la sonda en la botella, se mantiene una agitación constante con movimientos circulares y se registra el valor de la salinidad y la conductividad.

3.5 Calibración

La calibración se efectúa a partir de agua de mar estándar de 35 partes por mil de salinidad, si el equipo es conductímetro – salinómetro; para la calibración se pueden emplear estándares de conductividad comerciales o soluciones de KCl de concentración conocida, siguiendo las indicaciones del manual del equipo.

3.6 Cálculos

El salinómetro da directamente la medida de la salinidad en psu; en el caso de no contar con este equipo y disponer sólo de un conductímetro se recurre al algoritmo reportado en *Standard Methods*:

$$\text{Salinidad} = 0.008 - 0.1692 * R_t^{0.5} + 25.3851 * R_t + 14.0941 * R_t^{1.5} - 7.0261 * R_t^2 + 2.7081 * R_t^{2.5} + (T - 15) * (0.0005 - 0.0056 * R_t^{0.5} - 0.0066 * R_t - 0.0375 * R_t^{1.5} + 0.0636 * R_t^2 - 0.0144 * R_t^{2.5}) / (1 + 0.0162 * (T - 15))$$

$$R_t = C_o / 42914 / (0.6766097 + 0.0200564 * T + 0.0001104259 * T^2 - 0.00000069698 * T^3 + 0.0000000010031 * T^4)$$

$$C_o = C_e * (1 + 0.0184 * (T - 25))$$

R_t = Conductividad relativa a la temperatura de la muestra

C_e = Conductividad específica a 25 °C

C_o = Conductividad a la temperatura de la muestra

3.7 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edición 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-48 pp

WTW-ORION. Manual de instrucciones. Salinometer WTW-640

4. Transparencia

La turbidez en el agua es causada por material suspendido orgánico o inorgánico como arcilla, arena, limos, compuestos orgánicos solubles coloreados, plancton y otros organismos microscópicos.

La transparencia puede ser medida *in situ* o en laboratorio. Para la medición en el laboratorio, se determina la turbidez por medio de métodos tales como el nefelométrico y el visual (APHA, 1981). En condiciones de campo, un estimativo de la turbidez del agua es el obtenido con la aplicación del disco Secchi. En este manual se hará referencia únicamente a este método.

4.1 Materiales y equipos

Disco Secchi: disco de 20 cm de diámetro, dividido en 4/4, dos de ellos de color negro y los otros dos blancos, en forma alternada

Peso o lastre

4.2 Procedimiento

Sumergir el disco en el agua, mantenerlo vertical con la ayuda de un peso, anotar el valor de profundidad a la cual desaparece para el observador. La medición se debe hacer lo más verticalmente posible, y es preferible realizar las mediciones entre 10:00 am y 2:00 pm.

4.3 Bibliografía de consulta

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

SÓLIDOS

El término “sólidos” se refiere a la materia sólida suspendida o disuelta en el agua o en sus desechos. Los sólidos pueden afectar adversamente la calidad de las aguas en varias formas: aguas con alto contenido de sólidos son menos agradables para el gusto humano y pueden inducir a una reacción fisiológica desfavorable en el consumidor. Aguas altamente mineralizadas también son poco aptas para muchas aplicaciones industriales, por estas razones un límite de 500 mg/l de sólidos es deseable para aguas potables. Las aguas altamente mineralizadas son inútiles para muchas aplicaciones industriales; y las que poseen altos contenidos de sólidos disueltos pueden ser estéticamente insatisfactorias para propósitos como el baño (APHA, 1998).

Los sólidos totales son el material residual resultante en un recipiente luego de la evaporación de una muestra y su subsecuente secamiento en un horno a temperatura definida y constante; es decir, representan la suma de los sólidos disueltos o no retenidos a través de un filtro y los sólidos no disueltos o retenibles por filtración. Por tal razón, los diferentes tipos de sólidos son definidos arbitrariamente por el técnico al momento del análisis, según el método usado para su determinación.

Los resultados para sólidos totales, volátiles y fijos están sujetos a errores considerables, por pérdida

de compuestos volátiles durante la evaporación de CO₂ y minerales volátiles durante la calcinación. Los resultados de muestras que contengan aceites o grasas pueden ser de valores cuestionables por la dificultad en el secado a peso constante en un tiempo razonable. En aguas altamente mineralizadas con significantes contenidos de calcio, magnesio, cloruros y/o sulfatos pueden ser higroscópicos y requerir prolongados tiempos de secado; con la desventaja de ganar rápidamente peso durante la operación de pesado.

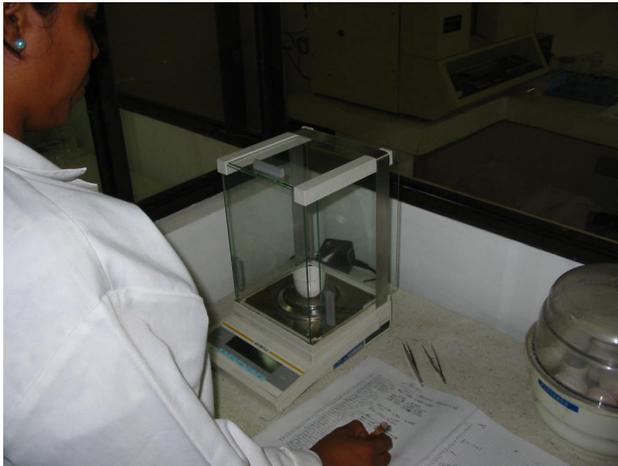
El analista debe seleccionar la temperatura que mejor se ajuste a la muestra. En cualquier caso deberá informarse la temperatura de secado.

Los envases plásticos son satisfactorios para la preservación de las muestras, las cuales deberán ser analizadas rápidamente para minimizar la posibilidad de cambios físicos o químicos durante el almacenaje. Deben excluirse partículas no representativas tales como restos de madera, organismos o materiales fecales presentes en la muestra.

Alcance y aplicación

Los métodos que se describen a continuación son aplicables a todo tipo de aguas naturales, efluentes industriales y domésticos; con los inconvenientes expuestos anteriormente. La precisión de los mis-

mos está relacionada con el proceso de pesaje, por lo tanto, es aconsejable utilizar una balanza analítica que de +/- 0.0001 g de precisión, aunque en el mercado ya es fácil conseguirlas de +/- 0.00001 g.



Balanza analítica empleada para la determinación de sólidos en muestras de agua

1. Sólidos totales a 103 - 105°C

Una muestra bien mezclada se evapora en una cápsula secada a peso constante en una estufa a 103 - 105 °C; el incremento de peso de la cápsula vacía representa el residuo total. Aunque en muestras de aguas residuales los resultados pueden no representar el peso real de sólidos disueltos y suspendidos, esta es una determinación útil en plantas de control.

Precisión del método

Análisis por duplicado de 41 muestras de agua y aguas de desecho fueron hechas encontrándose una desviaciones estándar de las diferencias de 6.0 mg/l (APHA, 1998).

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

De la botella Nansen o Niskin se llena un frasco de vidrio o polietileno con la muestra; de este mismo se puede extraer submuestras para la determinación de todos los sólidos (totales, suspendidos y volátiles); la cantidad recolectada debe ser la suficiente para permitir tal fin. Hay que tener precaución en el muestreo de aguas con alto contenido de sólidos sedimentables; la forma alargada de las botellas muestreadoras y un flujo muy lento para extraer la muestra por la llave, facilitan la sedimentación de los sólidos provocando diferencia en este parámetro entre las primeras y las últimas botellas receptoras que se llenan.

La muestra debe transportarse refrigerada al laboratorio a 4°C. Si el análisis no se puede realizar de inmediato se debe almacenar refrigerada por un periodo no superior a siete días. Antes de realizar el análisis se debe homogenizar la muestra agitando fuertemente.

1.2 Materiales y equipos

- Cápsulas de porcelana de 100 ml
- Mufla con rango de temperatura (T° ambiente - 1100°C)
- Horno con rango de temperatura (T° ambiente - 250 +/- 5 °C)
- Estufa de secado
- Desecador
- Balanza analítica (+/- 0.0001g)

1.3 Procedimiento

- Colocar una cápsula de porcelana limpia en una mufla a ignición a 550 °C por una

- Enfriar, desecar, pesar y guardar la cápsula en un desecador hasta ser utilizada.
- Transferir un volumen conocido de la muestra a la cápsula (50 ml) y evaporar a sequedad en un horno de secado a una temperatura de 98 °C para evitar ebullición y salpicaduras; elegir un volumen de muestra que produzca un residuo mínimo de 25 a 250 mg. Este volumen puede estimarse a partir de la conductividad; si es necesario, se pueden adicionar cantidades sucesivas de muestras a la misma cápsula
- Mantener durante una hora a 103 - 105 °C una vez evaporada
- Enfriar el recipiente en un desecador y posteriormente pesar
- Repetir el ciclo de secado a 103 - 105 °C, enfriando, desecando y pesando hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor que el 4% del peso previo

1.4 Cálculos

Los sólidos totales se calculan como:

$$\text{Sólidos (g/l)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{ml (muestra)}}$$

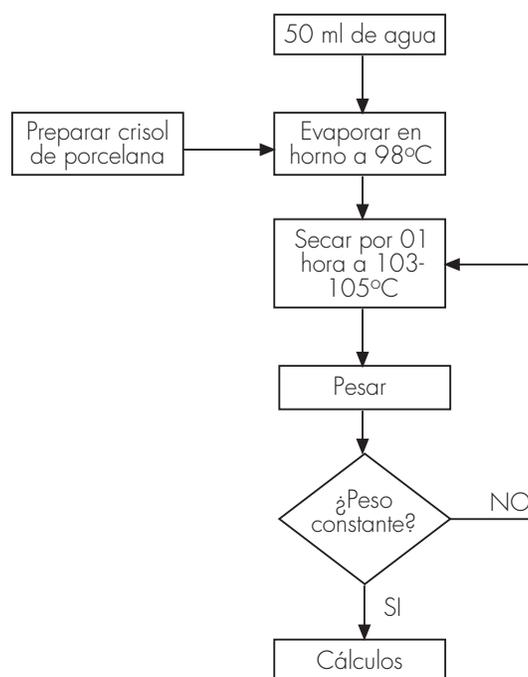
A = Peso cápsula más la muestra (g)

B = Peso cápsula (g)

Recomendaciones

Se deben excluir partículas grandes flotantes o aglomeradas sumergidas de materiales no heterogéneos en la muestra, y dispersar la grasa o el aceite flotante visible con un agitador antes de retirar una porción de muestra para el análisis.

1.5 Diagrama de flujo



1.6 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-56 pp.

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

2. Sólidos totales en suspensión (seco a 103 - 105 °C)

Los sólidos totales en suspensión son el material retenido sobre un filtro estándar después de la filtración de una muestra bien mezclada de agua. Estos sólidos son secados a 103 - 105 °C. Si el material suspendido se atasca en el filtro prolongando el tiempo de filtración, puede ser necesario incrementar el diámetro de los filtros o decrecer el volumen de muestra. Para obtener un estimativo de los sólidos en suspensión se puede calcular la diferencia entre los sólidos totales y los filtrables (disueltos) totales.

Precisión del método

En estudios hechos sobre dos analistas en cuatro sets de 10 determinaciones cada uno, la desviación estándar fue 5.2 mg/l (coeficiente de variación 33%) a 15 mg/l, 24 mg/l (10%) a 242 mg/l, y 13 mg/l (0.76%) a 1707 mg/l. Así mismo, se hicieron análisis por duplicado de 50 muestras de agua y aguas de desecho, encontrándose una desviación estándar de las diferencias de 2.8 mg/l. (APHA, 1998).

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

2.2 Materiales y equipos

Filtro (Millipore) o de fibra de vidrio
Equipo de filtración
Horno con rango de temperatura (T° ambiente - 250 +/- 5 °C)
Estufa de secado
Desecador
Balanza analítica (+/- 0.0001g)

2.3 Reactivos

Caolín
Agua desionizada

2.4 Procedimiento

Preparación del filtro

- Colocar el filtro en un equipo de filtración y aplicar vacío
- Lavar con 3 porciones sucesivas de 20 ml de agua destilada
- Secar durante una hora a 103 - 105 °C hasta obtener peso constante
- Colocar en desecador durante 30 minutos
- Pesar el filtro antes de usarlo

Tratamiento de la muestra

- Colocar el filtro en el equipo de filtración y pasar un volumen conocido (ml) de muestra, aplicando vacío
- Enjuagar el embudo y el filtro con agua destilada
- Remover y secar el filtro en un horno a 103 - 105 °C
- Llevarlo al desecador durante 30 minutos y pesar hasta alcanzar peso constante

Nota: Para muestras con altos contenidos de sales disueltas es necesario enjuagar el filtro con agua destilada para evitar problemas durante la pesada.

2.6 Cálculos

El contenido de sólidos suspendidos totales se calcula como:

$$\text{SST en mg/l} = \frac{(A - B) \times 10^6}{\text{ml (muestra)}}$$

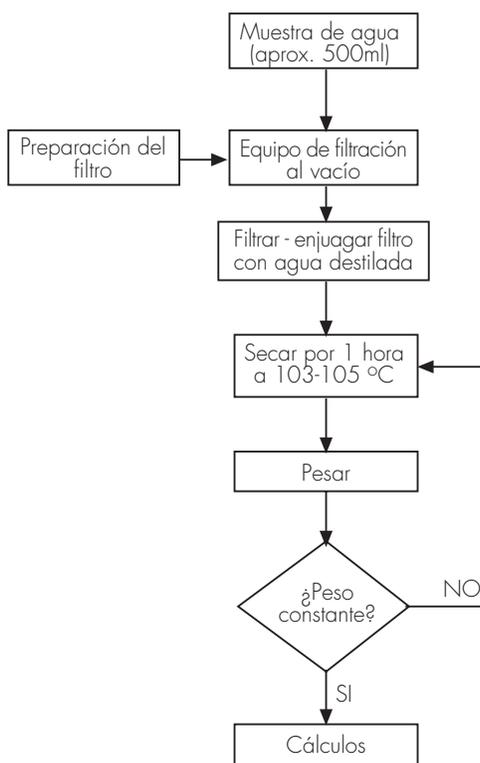
2.5 Calibración

Este método es necesario validarlo con miras a la acreditación de los laboratorios ambientales, para tal fin se evalúa el porcentaje de recuperación a partir de muestras con concentración conocida de caolín.

A = Peso filtro + residuo (g)

B = Peso filtro (g)

2.7 Diagrama de flujo



2.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-57 pp.

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

3. Sólidos fijos y volátiles totales a 550°C

Los componentes fijos y volátiles de los sólidos totales pueden ser determinados por ignición de la muestra a 550 +/- 25 °C. Esta determinación ofrece una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del desecho.

Precisión del método

Los errores negativos pueden ser producidos por pérdida de materia volátil durante el secado. En estudios realizados por tres laboratorios sobre cuatro muestras y 10 replicas, la desviación estándar fue de 11 mg/l a 170 mg/l de sólidos volátiles totales.

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

3.2 Materiales y equipos

Mufla con rango de temperatura (T° ambiente – 1100 °C)

Horno con rango de temperatura (T° ambiente – 250 +/- 5 °C)

Balanza analítica (+/- 0.0001 g)

Equipo de filtración

Cápsulas de porcelana de 100 ml

Desecador

3.3 Procedimiento

- Evaporar a 103 - 105 °C en una cápsula de porcelana un volumen conocido de muestra homogeneizada (50 ml)
- Someter a ignición el residuo obtenido hasta obtener peso constante en una mufla a 550 °C entre 15 y 20 minutos
- Dejar enfriar la cápsula parcialmente en el aire hasta que la mayor parte del calor se haya disipado y transfírala al desecador para enfriamiento total
- Una vez enfriada, pesar. Reportar como sólidos volátiles el peso perdido, y como residuo fijo total el material presente en la cápsula

3.4 Cálculos

Los sólidos volátiles se calculan como:

$$\text{Sólidos volátiles (mg/l)} = \frac{(A - B) \times 10^6}{\text{ml (muestra)}}$$

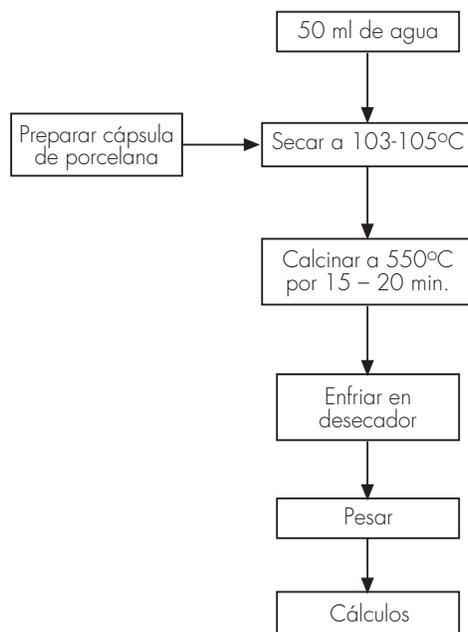
$$\text{Sólidos fijos (mg/l)} = \frac{(B - C) \times 10^6}{\text{ml (muestra)}}$$

A = Peso de la cápsula mas residuo antes de ignición (g)

B = Peso de la cápsula mas residuo después de ignición (g)

C = Peso de la cápsula vacía (g)

3.5 Diagrama de flujo



3.6 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-58 pp.

Rodier, J. 1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

4. Sólidos sedimentables

El material sedimentable en aguas superficiales y salinas así como en desechos domésticos e industriales, puede determinarse y reportarse sobre una base de volumen (ml/l) o de peso (mg/l).

Precisión del método

La precisión de este método aún no está disponible.

4.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

4.2 Materiales y equipos

La prueba volumétrica requiere únicamente un cono de Imhoff

Horno con rango de temperatura (T° ambiente - 250 +/- 5 °C)

Balanza analítica (+/- 0.0001g)

Filtro (Millipore) o de fibra de vidrio

Equipo de filtración

Estufa de secado

Desecador

4.3 Procedimiento

Por volumen

- Llenar el cono de Imhoff a la marca de un litro con una muestra bien mezclada a fondo, dejar en reposo por 45 minutos.
- Agitar ligeramente los lados del cono con una barra, dejar 15 minutos más y registrar el volumen de material sedimentado en el cono ml/l.

Nota: recuerde homogenizar bien la muestra antes de proceder a llenar el cono.

Por peso

- Determinar el contenido de sólidos en suspensión en mg/l para una submuestra (ver numeral 2.4)
- Colocar la muestra bien mezclada en un beaker de vidrio (o probeta), de no menos de 9 cm de

diámetro, usar una cantidad mínima de un litro o lo suficiente para dar una profundidad de 20 cm

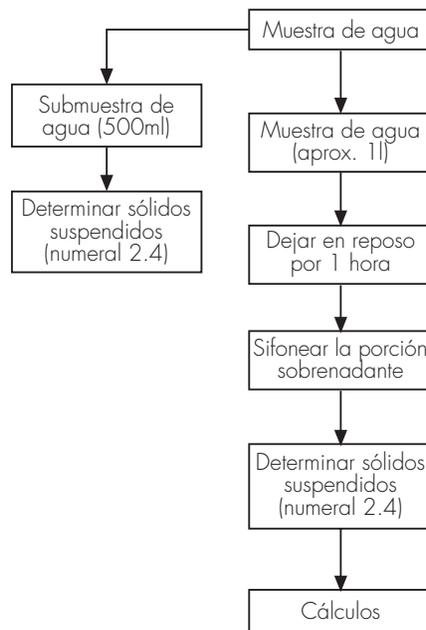
- Dejar reposar por una hora y sin remover el sedimento o el material flotante, sifonear 250 ml del centro del contenido a un punto medio entre la superficie del lodo sedimentado y la superficie del líquido.
- Determinar la materia suspendida en mg/l en la porción sobrenadante, como se indica en el numeral 2.4 (determinación de los sólidos en suspensión), esta es la materia no sedimentable.

4.4 Cálculos

Sólidos sedimentables (mg/l) = mg/l SS - mg/l de SNS

SS = Sólidos en suspensión
SNS = Sólidos no sedimentables

4.5 Diagrama de flujo



4.6 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-59 pp.

Rodier, J. 1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

5. Sólidos disueltos totales a 180 °C

Los sólidos disueltos son el material que pasa a través de un filtro (de fibra de vidrio o millipore) y que quedan después de la evaporación y secado a peso constante a 180 +/- 2 °C. El filtrado de los sólidos en suspensión (no filtrables) puede ser usado para la determinación de los sólidos disueltos.

Precisión del método

Análisis de 77 muestras de concentración conocida de 293 mg/l fueron hechas encontrándose una desviación estándar de las diferencias de 21.20 mg/l (APHA, 1998).

5.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

5.2 Materiales y equipos

Horno con rango de temperatura (T° ambiente - 250 +/- 2 °C)

Mufla con rango de temperatura (T° ambiente - 1100 °C)

Balanza analítica (+/- 0.0001 g)

Filtro (Millipore) o de fibra de vidrio

Cápsulas de porcelana de 100 ml

Equipo de filtración

Estufa de secado

Desecador

5.3 Procedimiento

Preparación del filtro

El filtro Millipore o fibra de vidrio, se prepara igual que para los sólidos en suspensión. Ver numeral 2.4.

Preparación del recipiente para evaporación

Colocar el recipiente limpio a ignición a 550 °C por una hora, enfriarlo y guardarlo en el desecador hasta que se vaya a utilizar, pesar inmediatamente antes de usarlo.

Análisis de muestra

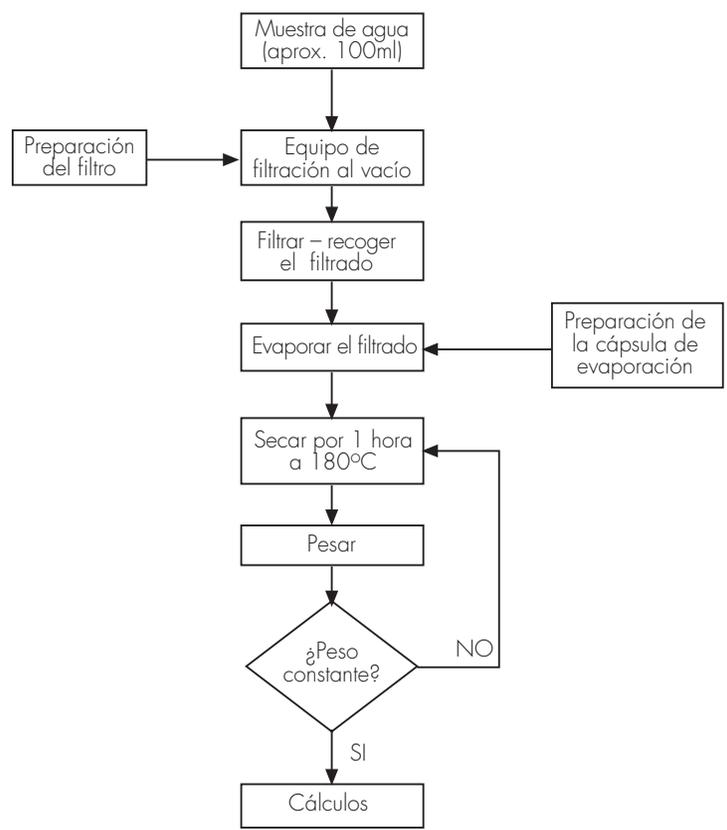
- Usar una muestra que produzca no más de 200 mg de residuo filtrable total (sólidos)
- Filtrar 100 ml, o más de la muestra bien mezclada al vacío a través del filtro
- Continuar la succión por cerca de tres minutos después de la filtración hasta succionar toda el agua que sea posible.
- Transferir 100 ml del filtrado a un recipiente de evaporación tarado, y evaporar a sequedad sobre un baño de vapor, secar la muestra evaporada al menos una hora en un horno a 180°C; enfriar en un desecador y pesar. Repetir el ciclo, secando hasta obtener un peso constante o hasta que el peso varíe en menos de 0.5 mg.

5.4 Cálculos

$$\text{Sólidos disueltos (g/l)} = \frac{(A - B) \times 1000}{C}$$

- A = Peso recipiente más residuo seco (g)
- B = Peso del recipiente vacío (g)
- C = Volumen de filtrado usado (ml)

5.5 Diagrama de flujo



5.6 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 2-56 pp.

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

NUTRIENTES MARINOS

El agua marina está constituida por diversos constituyentes inorgánicos, los principales cationes son: calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}), sodio (Na^+) y potasio (K^+); los aniones principales son: ion cloruro (Cl^-), sulfato (SO_4^{-}), carbonato (CO_3^{-2}) y bicarbonato (HCO_3^{-}). Algunos iones de los constituyentes secundarios son los reconocidos con el nombre de nutrientes, puesto que pertenecen a algunas sales que son utilizadas por los vegetales marinos, (algas) para formar sus tejidos y tienen una significación biológica especial. Estos se presentan en el agua de mar en concentraciones variables, según la actividad biológica, y entre ellos se encuentran el fosfato (PO_4^{-3}), nitrato (NO_3^{-}), nitrito (NO_2^{-}), silicato [$\text{Si}(\text{OH})_4$] y amonio (NH_4^+), (Margalef, 1982).

Los nutrientes están presentes en diferentes formas en los sistemas acuáticos y solamente las formas inorgánicas disueltas se encuentran disponibles para los productores primarios.

El nitrógeno gaseoso en los océanos es aproximadamente 30 veces más abundante que la suma de sus formas inorgánicas (amonio, nitrito, nitrato). Sin embargo, el nitrógeno molecular es relativamente inerte y para ser utilizado por los organismos debe estar en formas disponibles (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), los nitratos representan la forma más oxidada del nitrógeno inorgánico y los nitritos son

las sustancias intermedias que se presentan durante el proceso de oxidación del amonio a nitratos. Los niveles de amonio ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) se deben a la actividad biológica, principalmente (Carpenter, 1983).



Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer-Lambda 12, utilizado en la determinación de nutrientes en muestras ambientales

El enriquecimiento de nutrientes debido a la entrada de materia orgánica (MO), eleva la producción de algas, fenómeno conocido como eutroficación. Algunos efectos de dicho fenómeno son el olor desagradable del agua debido a la abundancia de algas y el elevado consumo de oxígeno disuelto por parte de las bacterias en res-

puesta a la mayor concentración de MO, afectando a las especies acuáticas (Kiely, 1999).

1. Determinación de amonio (método del azul de indofenol)

El conocimiento del contenido de amonio en agua marina es de valor considerable para el estudio del ciclo del nitrógeno en los océanos. El amonio en el mar proviene principalmente de las excreciones de animales marinos y la descomposición de compuestos orgánicos nitrogenados, provenientes a su vez de organismos muertos. Diversos seres fitoplanctónicos utilizan el amonio y lo convierten nuevamente en compuestos orgánicos nitrogenados, también puede ser oxidado por acción química, fotoquímica o bacteriana a nitrito y luego a nitrato (Riley, 1953).

Aunque en la actualidad, existen diversos métodos para determinación de amonio, el propuesto por Riley (1953) y modificado por Strickland & Parsons (1968 - 1972) es el de mayor uso y se conoce muy ampliamente como el método del *azul de indofenol*.

El ion amonio presente en el agua de mar reacciona en un medio citrato alcalino con hipoclorito de sodio para formar monocloraamina, la cual en presencia de fenol y nitropruciato de sodio, que actúa como catalizador, forma el azul de indofenol y un complejo de citrato con los iones Ca y Mg, eliminando así, la interferencia que estos puedan causar al precipitarse durante el análisis. La absorbancia de la solución resultante se mide espectrofotométricamente a 640 nm.

Alcance y aplicación

El método es específico para ion amonio y aplicable a todo tipo de aguas naturales. La mínima cantidad de amonio detectable en celda de 10 cm es de 0.1 $\mu\text{g.at.N-NH}_4/\text{l}$.

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La colección de muestras se realiza mediante el uso de botellas Niskin, Nansen u otra apropiada. De éstas, se transfiere a una botella plástica de 500 ml, previamente lavada y purgada. Normalmente, la cantidad colectada en la última botella, sirve para efectuar todos los análisis de nutrientes.

Antes de proceder al análisis es necesario filtrar la muestra para evitar las interferencias por el material suspendido. Es conveniente efectuar el análisis inmediatamente después de realizada la colección; pero si esto no es posible, se deben almacenar en un sitio oscuro y congeladas a -20°C . Es preferible el uso de congelación instantánea con CO_2 .

1.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS con un rango de 400 - 900 nm
 Celdas de vidrio con 10 ó 1 cm de paso óptico
 Viales de 40 ml
 Dosificadores o pipetas de 1 ml
 Dosificadores o pipetas de 2 ml
 Pipetas aforadas de 25, 10, 5, 2 y 1 ml
 Probetas de 100 y 50 ml
 Matraces aforadas de diferentes capacidades
 Vasos de precipitado de 100 y 50 ml

1.3 Reactivos

Agua desionizada: Debe utilizarse agua recientemente desionizada para la preparación de reactivos, estándares y blancos, la cual debe almacenarse en recipiente de vidrio bien tapado. No cumplir esta precaución, conduce invariablemente a una cuantificación deficiente del amonio.

Solución de fenol: Disolver 25 g de fenol (C_6H_5OH) R.A. en 250 ml de etanol (C_2H_5OH) al 95%, guardar la solución refrigerada en frasco ámbar.

Solución de nitroprusiato de sodio [$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$]: Disolver 0.5 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua desionizada y completar a 500 ml, guardar refrigerada en botella de color ámbar (*La solución es estable durante 4 semanas*).

Reactivo alcalino: Disolver 100 g de citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) R.A. y 5 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua desionizada y completar a 500 ml.). Almacenar en recipiente de vidrio (*La solución es estable durante varios meses*).

Hipoclorito de sodio (NaClO): Usar una solución 1.5 N. En su defecto usar hipoclorito de sodio comercial al 12%.

Solución oxidante: Mezclar 60 ml del reactivo alcalino y 15 ml de hipoclorito de sodio. Esta mezcla debe prepararse únicamente el día que se va a utilizar, los sobrantes deben descartarse. Es preciso mantener la solución tapada mientras no está en uso.

Solución estándar de amonio: Disolver 0.0535 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) grado analítico (previamente seco a $104^\circ C$ durante dos horas), en 100 ml de agua desionizada. Adicionar 50 μl de cloroformo como preservante y almacenar refrigerada; la solución bien sellada es estable por

varios meses. La concentración de esta solución es de 10000 $\mu g.at /l$.

1.4 Procedimiento

- Filtrar la muestra de ser necesario antes de proceder al análisis
- Adicionar 25 ml de muestra en un vial de 40 ml
- Adicionar 1 ml de solución de fenol, agitar
- Agregar 1 ml de nitroprusiato de sodio, agitar
- Adicionar 2.5 ml de solución oxidante y agitar
- Mantener los viales cubiertos con papel aluminio o tapados y en la obscuridad, en una habitación con temperatura entre 20 y $27^\circ C$ durante una hora
- Leer la absorbancia a 640 nm para todas las muestras
- Calcular la concentración de amonio
- Con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra patrón de 3.0 $\mu g at/l$ (cuando se usa celda de 10 cm)

Determinación del blanco

Siga el método descrito para la muestra usando 25 ml de agua desionizada.

1.5 Calibración

- Stock secundario. Medir 1 ml de la solución patrón y llevar a 100 ml con agua desionizada; la concentración de esta nueva solución es de 100 $\mu mol/l$
- Tomar 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 ml del stock secundario y completar a 25 ml, con agua desionizada; las concentraciones de estas soluciones son 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu g.at.N/l$ respectivamente, o seleccionar concentraciones que estén en el rango de trabajo de las muestras

- Aplicar el proceso descrito para la muestra y el blanco

Deberá aplicarse una regresión lineal a los resultados y calcular la concentración de la siguiente forma. Determine la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración. $[Y = mX+b]$.

$$\text{Abs} = C * m + b$$

Y = Abs = Valor de la absorbancia del estandar

X = C = Concentración del estandar
($\mu\text{g.at.N/l}$)

b = Intercepto

Nota:

- La linealidad se mantiene hasta los $40 \mu\text{moles/l}$
- La calibración también se puede trabajar con soluciones patrón preparadas con agua de mar natural pobre en amonio

1.6 Cálculos

De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, así:

$$C = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

C = Concentración de la muestra en $\mu\text{g.at.N/l}$

Abs = Absorbancia de la muestra corregida
(menos la absorbancia del blanco)

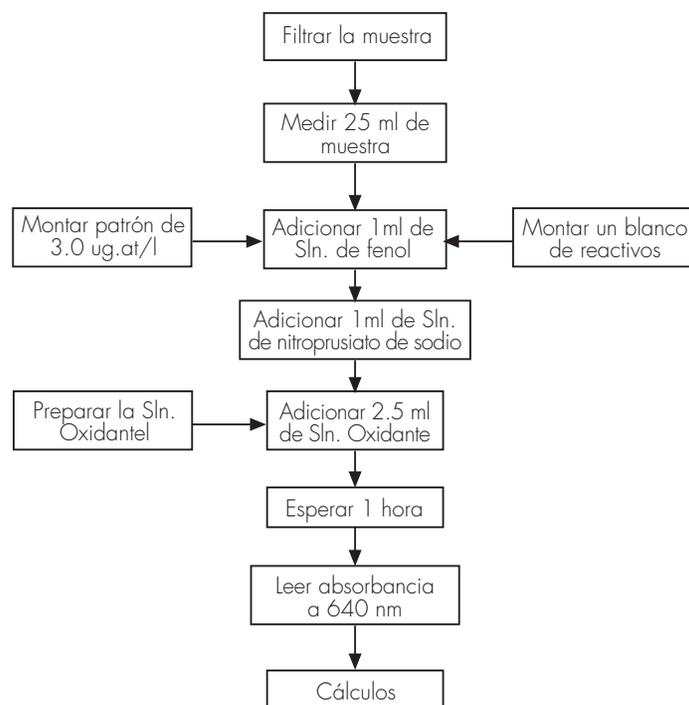
b = Intercepto

m = Pendiente de la curva de regresión

Recomendaciones

- Todo el material de vidrio a ser utilizado debe lavarse con ácido clorhídrico diluido al 5% y enjuagarse con agua desionizada recientemente obtenida
- Bajo ninguna circunstancia se debe abrir un frasco que contenga amoniaco cuando se esté efectuando el análisis de amonio
- La boca de los viales debe cubrirse con papel de aluminio, o mantenerse tapada para reducir la contaminación de amoniaco atmosférico
- Se deben elaborar por lo menos dos blancos de reactivos sobre agua desionizada, para hacer la corrección correspondiente a las muestras
- Es bueno mantener apartados los materiales y pipetas que se utilizan para esta prueba ya que fácilmente pueden resultar contaminados con los reactivos usados en otros análisis
- Todos los erlenmeyers deben protegerse de la luz para evitar sobreproducción del azul por alta intensidad lumínica
- Diariamente debe leerse entre las muestras un patrón de $3.0 \mu\text{g.at/l}$ para mantener estadísticamente controlado el método mediante el registro en una carta de control.

1.7 Diagrama de flujo



1.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Riley, J.P. 1953. The Spectrophotometric Determination of amonia in natural water with particular reference to sea-water Anal. Chim. Acta Vol 9: 575-589.

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1968. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

2. Determinación de nitritos

Los nitritos representan una forma intermedia en el ciclo del nitrógeno; pueden estar presentes en las aguas como resultado de la degradación biológica de las proteínas o provenir de otras fuentes.

La mayoría de los métodos para la evaluación de iones nitrito se basan en la clásica reacción de Griess (1879) modificada por Llosvay (1889), mediante la cual se convierte ácido nitroso en una tintura fuertemente coloreada, empleando una amina aromática primaria para diazotar el ion nitrito, acoplando posteriormente el ion diazo resultante con otra amina aromática en una reacción que lleva a la formación de un compuesto azo rosado, cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de nitrito inicialmente presente.

Las combinaciones de aminas que resultan en compuestos azo con absorbancias suficientemente altas para permitir su aplicación en el análisis de las cantidades traza en que se encuentra normalmente el nitrito en el agua de mar, son muy pocas. Los procedimientos empleados inicialmente consistían en modificaciones de Griess-Llosvay, donde se utilizaba ácido sulfanílico para la diazotación y la 1-naftilamina para el acoplamiento. La más apropiada de estas modificaciones es la indicada por Barnes (1959), que se basa en el procedimiento desarrollado por Rider & Mellon (1946).

El uso de la anterior combinación de reactivos ha sido desechado para evitar el riesgo de trabajar con la potencialmente carcinógena 1-naftilamina por haberse encontrado el método de la sulfanilamida y diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina que da mejores resultados. Este método fue desarrollado por Shinn (1941) y modificado por Bendschneider y Robinson (1952); actualmente es el de mayor aceptación por la comunidad de laboratorios oceanográficos. En principio el nitrito NO_2^- es determinado a través de la formación de un compuesto azo rojo producido a un pH de 2 a 2.5, acoplando sulfanilamida diazotizada con N-(1-naftil)etilendiamina dicloruro (NED dicloruro). La absorbancia de la solución es medida a 543 nm para su posterior cuantificación.

Alcance y aplicación

El método es aplicable a todo tipo de aguas, especialmente de mar, pero puede presentar problemas con aguas coloreadas. La reacción colorimétrica es específica para iones nitrito, sin embargo, pueden causar interferencias los iones Cu^{2+} en concentraciones mayores de 0.5 mg/l y los iones sulfuro en concentraciones superiores a 60 μg de S^{2-} /l.

La mínima cantidad de nitrito detectable por este método, usando celda de 10 cm es de 0.01 μg .at.N- NO_2^- /l.

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

2.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS, con rango espectral de 400-900 nm

Celdas de 10 ó 1 cm de paso óptico

Viales de 40 ml

Dosificadores o pipetas de 1 ml

Pipetas aforadas de 25, 10, 5, 2 y 1 ml

Probetas de 100 y 50 ml

Matraces aforadas de diferentes capacidades

2.3 Reactivos

Solución de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$): Disolver 2.5 g de sulfanilamida R.A. en 25 ml de ácido clorhídrico concentrado y añadir 150 ml de agua destilada, mezclar y completar a 250 ml, guardar en un frasco ámbar. Esta solución es estable por varias semanas en oscuridad.

Solución de diclorohidrato de N-(1-naftil)etilendiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$): Disolver 0.5 g de reactivo puro en agua destilada y completar a 500 ml, almacenar en un frasco ámbar. La solución es estable por un mes. Debe renovarse cuando desarrolle una coloración café.

Estándar de nitrito: Disolver 0.0690 g de nitrito de sodio (NaNO_2) previamente seco a 105°C por dos horas en agua destilada y completar exactamente a 100 ml. Almacenar en botella oscura con 50 μl de cloroformo como preservativo. La concentración de esta solución es de 10000 μg .at/l.

2.4 Procedimiento

- Depositar en los viales de reacción, 25 ml de cada muestra de agua filtrada
- Agregar a cada frasco 0.5 ml de la solución de sulfanilamida. Mezclar y dejar en reposo entre 2 y 8 minutos
- Adicionar 0.5 ml de solución de N-(1-naftiletildiamina) y mezclar
- Dejar en reposo mínimo 10 minutos para empezar a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 543 nm
- Con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra patrón de 1.0 µg.at/l (cuando se usa celda de 10 cm)

Determinación del blanco

Siga el método descrito para la muestra usando 25 ml de agua desionizada

2.5 Calibración

- Stock secundario: Medir 1.0 ml de la solución patrón y llevar a 100 ml con agua desionizada, la concentración de esta nueva solución es de 100 µmol/l
- Tomar 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 ml de la solución secundaria y completar a 25 ml, con agua desionizada en balones aforados; las concentraciones de estas soluciones son 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 µg.at.N/l respectivamente, o seleccionar concentraciones que estén en el rango de trabajo de las muestras
- Aplicar el proceso descrito para la muestra y el blanco.

Aplique una regresión lineal a los resultados y calcule la concentración de la siguiente forma. De-

termine la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración. [$Y = mX + b$].

$$\text{Abs} = C * m + b$$

Y = Abs = Valor de la absorbancia de la muestra
 X = C = Concentración de los estandares (µg.at.N/l)
 b = Intercepto

2.6 Cálculos

De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, así:

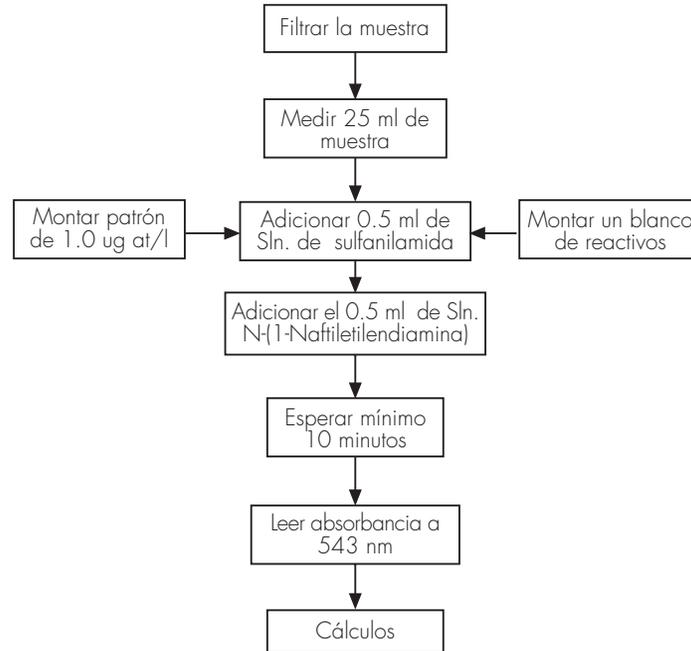
$$C = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

C = Concentración de la muestra en µg.at.N/l
 Abs = Absorbancia de la muestra corregida (menos la absorbancia del blanco)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

Recomendaciones

- Diariamente deberá leerse un blanco de reactivos y un patrón de 1.0 µg.at/l entre las muestras para mantener estadísticamente controlado el método mediante el registro en una carta de control
- Se recomienda mantener el ambiente en un rango de 15 - 25°C
- El desarrollo de la coloración se completa a los 10 minutos y permanece constante por lo menos dos horas, después de los cuales puede haber alteración.

2.7 Diagrama de flujo



2.8 Bibliografía

Bendschneider, K, Robinson, R. 1952. A New Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite in Sea Water. *Journal of Marine Research* 11:87 - 96.

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros físico-químicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

3. Determinación de nitrato (reducción con Cd)

La mayor parte del nitrógeno en el mar se halla en forma de iones nitrato, su concentración normalmente varía entre 25 - 500 μg de $\text{N-NO}_3/\text{l}$ (Morris y Riley, 1963).

Los principales métodos para evaluación de iones nitrato, en agua de mar se basan: (a) En la reducción a iones nitrito, y la subsecuente evaluación de éstos por métodos colorimétricos. (b) En la reacción colorimétrica como resultado de las propiedades oxidantes del ácido sulfúrico. (c) En determinación polarográfica; y (d) por espectrometría ultravioleta.

El método descrito por Strickland & Parsons (1972), se basa en el de Morris y Riley (1963), incluyendo el uso de cloruro de amonio como activante,

descrito por Grasshoff (1964) y columnas empacadas con amalgama de Cd - Cu (Wood, et. al., 1967).

El ion nitrato de agua de mar se reduce cuantitativamente a ion nitrito, cuando la muestra se hace fluir a través de una columna que contiene cadmio recubierto con cobre coloidal. Como la reducción debe realizarse a un pH cercano a 8.5 antes de pasar la muestra por la columna, se la trata con solución de cloruro de amonio, que actúa como Buffer y a la vez da origen a complejos de cadmio y otros iones eliminando de esta forma las interferencias que ellos pueden causar al precipitarse durante el análisis. El ion nitrito resultante de la reducción, se determina de acuerdo con el método descrito para ello.

Alcance y aplicación

Es aplicable a todo tipo de aguas, la eficiencia de reducción está alrededor del 95%. Los cambios de temperatura entre 10 y 35°C no tienen efecto sobre la reducción.

La cantidad mínima detectable usando celdas de 10 cm es de 0.05 µg.at. N-NO₃/l. Las absorbancias obedecen la ley de Lambert Beer hasta los 50 µmoles/l, lo que permite una determinación directa en todo el rango de concentraciones que se encuentra en el agua de mar.

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

3.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS con rango espectral de 400-900 nm

Celdas de vidrio de 1 ó 10 cm de paso óptico

Columnas de vidrio para la reducción

Viales de 40 ml

Balones aforadas de diferentes capacidades

Probetas de 100 y 25 ml

Dosificadoras o pipetas de 1 ml

Frasco lavador

3.3 Reactivos

Solución concentrada de cloruro de amonio (NH₄Cl): Disolver 125 g de cloruro de amonio en 500 ml de agua desionizada. Guardar en botella plástica o de vidrio bajo refrigeración. La solución es estable varias semanas.

Solución diluida de cloruro de amonio: Diluir 25 ml de la solución concentrada a 1000 ml con agua desionizada. Guardar la solución en botella plástica o vidrio bajo refrigeración. La solución es estable varias semanas.

Solución de sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S): Disolver 2.5 g de sulfanilamida en 25 ml de ácido clorhídrico concentrado y añadir 150 ml de agua destilada, mezclar y completar a 250 ml, guardar en un frasco ámbar. Esta solución es estable por varias semanas en oscuridad.

Solución de diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂): Disolver 0.5 g de reactivo puro en agua destilada y completar a 500 ml, almacenar en un frasco ámbar. La solución es estable por un mes y debe renovarse cuando desarrolle una coloración café.

Solución de ácido clorhídrico 2N (HCl): Diluir 170 ml de ácido clorhídrico concentrado con agua desionizada y completar un litro.

Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 2% (CuSO₄.5H₂O): Disolver 10 g de sulfato en 500 ml de agua desionizada.

Cadmio (Cd) metálico granulado.

Solución estándar de nitrato: Disolver 0.1011 g de Nitrato de Potasio (KNO_3) calidad reactivo (previamente seco a 104°C durante dos horas), en 100 ml de agua destilada. La concentración de esta solución es de $10000 \mu\text{g.at/l}$. La solución es generalmente estable en ausencia de evaporación.

3.4 Procedimiento

Preparación de la columna

- Seleccionar, utilizando un tamiz, las limaduras de cadmio que se emplearán para rellenar las columnas (tamaño entre 0.5 y 2.0 mm). Tener precaución de no inhalar el polvo de cadmio
- Lavar aproximadamente 100 g de las limaduras de cadmio seleccionadas (suficiente para 5 columnas) con la solución de HCl en un embudo de separación y luego enjuagar perfectamente con agua desionizada
- Tratar el cadmio con 500 ml de solución de sulfato de cobre en un erlenmeyer y agitar. Este tratamiento se continúa hasta que todo el color azul haya desaparecido de la solución y las partículas de cobre semicoloidales, comiencen a aparecer en el líquido sobrante
- Enjuagar las limaduras con suficiente agua desionizada; a partir de este momento el cadmio no debe entrar en contacto con el aire
- Empacar la columna con las limaduras de Cd-Cu hasta alcanzar una altura aproximada de 20 cm. Se debe tener cuidado de no dejar espacios sobre el lecho Cd - Cu
- Graduar la velocidad de flujo a una razón de 10 ml por minuto. Si el flujo es menor, la columna debe ser reempacada
- Lavar completamente la columna haciendo fluir dos porciones de 50 ml de cloruro de amonio diluido. Luego, dejar en reposo 24 horas y antes de usar, lavar de 3 a 4 veces con cloruro de amonio diluido

- Activar la columna con una solución de un estándar de nitratos de $20 \mu\text{g.at. N-NO}_3^-/\text{l}$ y proceder luego a lavarla varias veces con solución de cloruro de amonio diluido
- Cuando las columnas no se usen, se deben dejar con solución de cloruro de amonio diluido y tapadas con papel aluminio para evitar que se sequen

Tratamiento de muestras

- En erlenmeyer de 100 ml, depositar 50 ml de muestra filtrada y adicionar 1 ml de cloruro de amonio concentrado y mezclar
- Depositar la muestra en la columna de reducción. Recibir los primeros 20 ml en una probeta graduada de 25ml y desecharlos
- Sin suspender el flujo, reemplazar rápidamente la probeta por el frasco de reacción y continuar recibiendo la solución hasta obtener 25 ml de muestra reducida. Tapar el frasco
- Dejar drenar el resto de muestra y descartarla
- Enjuagar la columna con aproximadamente 25 ml de cloruro de amonio diluido
- Sin permitir que se seque la columna, empezar a depositar la muestra siguiente, a la cual previamente se ha adicionado 1 ml de cloruro de amonio concentrado, aplicando igualmente los pasos anteriores
- Una vez reducidas todas las muestras de agua, aplicar este procedimiento a 25 ml de una solución patrón de $1.0 \mu\text{g-at/l}$
- A los 25 ml de muestra, agregar 0.5 ml de la solución de sulfanilamida. Mezclar y dejar en reposo entre 2 y 8 minutos
- Adicionar 0.5 ml de solución de N-(1-naftiletildiamina) y mezclar
- Dejar en reposo mínimo 10 minutos para empezar a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 543 nm
- Con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra patrón de $1.0 \mu\text{g at/l}$

Determinación del blanco

Llevar a cabo el proceso de análisis usando 50 ml de cloruro de amonio diluido en lugar de muestra. Medir la absorbancia, usando la misma celda que para las muestras y restar el valor del blanco para cada absorbancia de muestra.

$$C = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

- C = Concentración de nitratos y nitritos en la muestra en $\mu\text{g.at.N/l}$
 Abs = Absorbancia de la muestra corregida (menos la absorbancia del blanco)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

3.5 Calibración

- Stock secundario: Medir 1.0 ml de la solución patrón y llevar a 100 ml con agua desionizada, la concentración de esta nueva solución es de 100 $\mu\text{mol/l}$
- Tomar 0.25 ml de la solución secundaria y completar a 25 ml con agua desionizada en balón aforado; la concentración de esta solución es 1.0 $\mu\text{g.at.N/l}$ y se utilizará como patrón diario, con el fin de mantener estadísticamente controlado el método mediante el registro en una carta de control y evaluar la eficiencia de los reductores

Después de aplicar el procedimiento descrito anteriormente en la muestra se obtienen son nitritos, por tal razón para la cuantificación se emplea la curva de calibración que se obtuvo para estos compuestos, ver numerales 2.5 y 2.6.

3.6 Cálculos

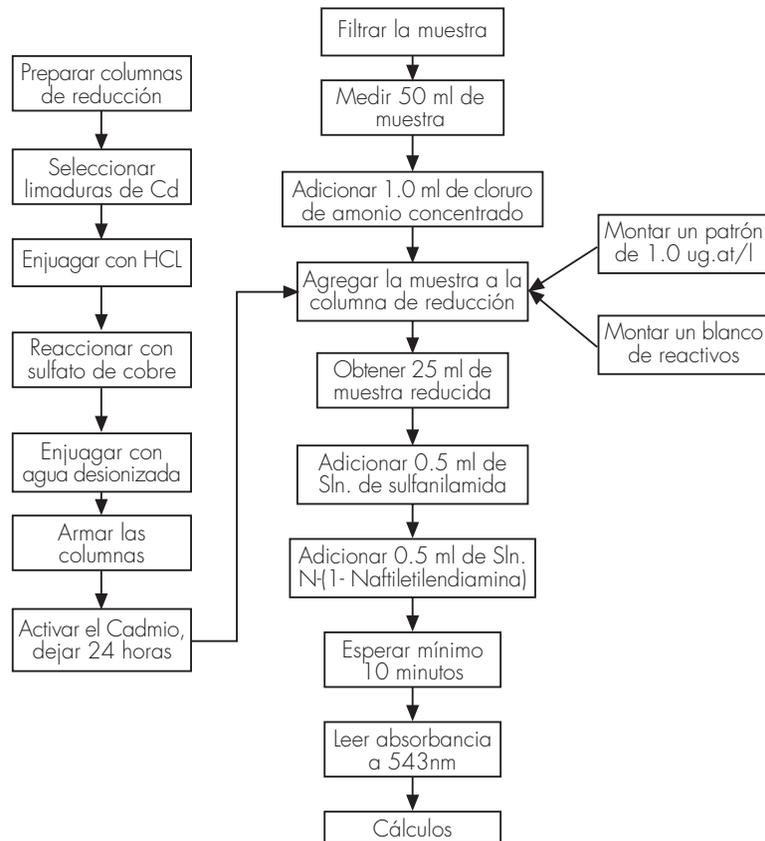
De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de nitratos y nitritos en la muestra, así:

Para obtener la concentración real de nitratos es necesario restarle al valor obtenido la concentración inicial de nitritos, tal como se obtuvo en el numeral 2.6.

Recomendaciones

- El rendimiento o eficiencia de los reductores (columnas) se chequea diariamente con la muestra patrón, si el rendimiento es inferior a 0.8 se debe regenerar la columna
- Las limaduras de Cd-Cu deben ser reactivadas después de uso continuado. La eficiencia de las columnas deben determinarse por lo menos cada 30 muestras; cuando la pérdida de eficiencia es significativa deberán regenerarse las columnas

3.7 Diagrama de flujo



3.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Morris, A.W. y J.P. Riley. The Determination of Nitrate in Sea Water. Anal. Chim. Act 29: 272-279.

Rodier, J.1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

4. Determinación de nitrato por espectrometría ultravioleta

La medida de la absorción UV a 220 nm permite una rápida determinación de NO_3^- . Como la materia orgánica también puede absorber a 220 nm y NO_3^- no absorbe a 275 nm, una segunda medición hecha a 275 nm puede ser usada para corregir el valor de NO_3^- . La extensión de esta corrección empírica está relacionada con la naturaleza y la concentración de la materia orgánica (MO) y puede variar de un agua a otra. Consecuentemente, este método no es recomendable si se requiere una corrección significativa en la absorbancia por MO, pero puede ser útil en el monitoreo de NO_3^- en cuerpos de agua con un tipo de materia orgánica constante.

Los factores de corrección para MO pueden ser establecidos por el método de adición en combinación con el análisis del contenido de NO_3^- original por otro método. La filtración de la muestra se requiere para evitar interferencias con partículas suspendidas. La acidificación con HCl 1N es diseñada para prevenir las interferencias de concentraciones de hidróxido o carbonato superiores a los 1000 mg CaCO_3/l , los cloruros no tiene efecto sobre la determinación.

Adicional a la materia orgánica disuelta, los surfactantes, NO_2^- , y Cr^6 y varios iones inorgánicos que normalmente no se encuentran en el agua natural como los cloritos y cloratos pueden causar interferencias.

Alcance y aplicación

Esta técnica es útil sólo para muestras que tienen bajos contenidos de materia orgánica, por ejemplo, aguas naturales sin contaminación y suministros de agua potable. Las curvas de calibración de NO_3^- siguen la ley de Beer hasta los 11 mg N/l (APHA, 1998).

La precisión del método aún no está disponible.

4.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

4.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro UV- VIS para usar a 220 y 275 nm
Celdas de cuarzo de 1 ó 10 cm de paso óptico
Viales de 40 ml
Balones aforadas de diferentes capacidades
Probetas de 100 y 25 ml
Dosificadoras o pipetas de 1 ml

Frasco lavador

4.3 Reactivos

Agua libre de nitratos: Usar agua bidestilada, o desionizada de alta pureza para preparar todas las soluciones y diluciones requeridas.

Solución de ácido clorhídrico 1N (HCl): Diluir 85 ml de ácido clorhídrico concentrado con agua desionizada y completar un litro.

Solución estándar de nitrato: Disolver 0.7218 g de Nitrato de Potasio (KNO_3) calidad reactivo (previamente seco a 104°C durante 24 horas), en 1000 ml de agua destilada; 1.00 ml = 100 μg NO_3^- - N. Preservar con 2 ml de CHCl_3 . La solución es generalmente estable en ausencia de evaporación por lo menos 6 meses.

4.4 Procedimiento

Tratamiento de muestras

- En un erlenmeyer de 100 ml, depositar 50 ml de muestra filtrada y adicionar 1 ml de HCl y agitar vigorosamente
- Leer las absorbancias de las muestras contra una celda con agua bidestilada. Usar la longitud de onda de 220 nm para obtener la lectura de NO_3^- y a 275 nm para determinar las interferencias debidas a materia orgánica disuelta
- Con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra patrón de 3 mg. NO_3^- -N/l

Determinación del blanco

Llevar a cabo el proceso de análisis usando 50 ml de agua bidestilada en lugar de muestra. Medir las

absorbancias usando la misma celda que para las muestras y restar el valor del blanco para cada concentración de muestra.

4.5 Calibración

- Stock secundario. Medir 100.0 ml de la solución patrón y llevar a 1000 ml con agua bidestilada; la concentración de esta nueva solución es de 10.0 ug NO₃⁻ - N/l. Preservar con 2 ml de CHCl₃
- Preparar una curva de calibración entre el rango de 0 – 7 mg NO₃⁻ - N/l ; diluyendo a 50 ml los siguientes volúmenes de solución stock secundario: 0, 1.0, 2.0, 4.0, 7.0,... 35.0 ml
- Tratar los estándares de NO₃⁻ de la misma manera que las muestras

Aplicar una regresión lineal a los resultados y calcular la concentración de la siguiente forma: Determinar la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración [Y = mX+b] y corregir la absorbancia de los estándares restando dos veces la absorbancia leída a 275 nm a la lectura de absorbancia de 220 nm.

$$Abs_{COR} = C * m + b$$

$$Abs_{COR} = Abs_{220} - 2 * Abs_{275}$$

- Abs₂₂₀ = Absorbancia leída a 220 nm
- Abs₂₇₅ = Absorbancia leída a 275 nm
- Y = Abs_{COR} = Valor de la absorbancia corregida para el estándar
- X = C = Concentración del estándar en mg NO₃⁻ - N/l
- b = Intercepto

4.6 Cálculos

De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, usando las absorbancias corregidas de las mismas.

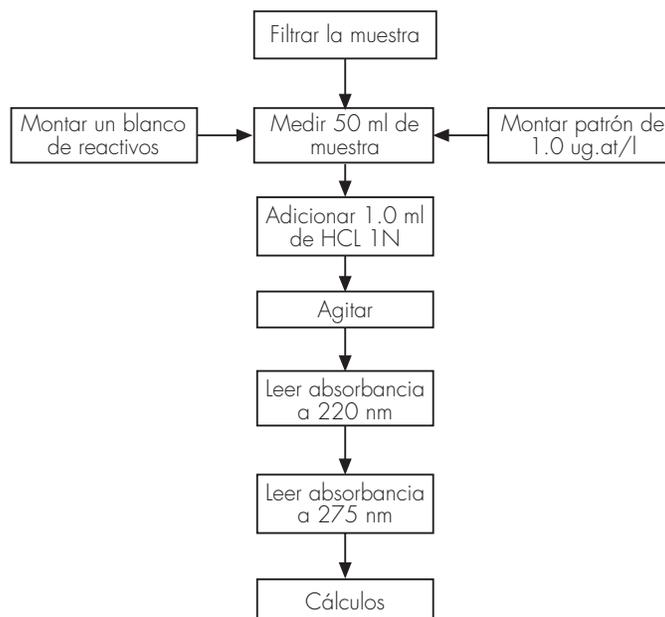
$$C = \frac{Abs_{COR} - b}{m}$$

- C = Concentración de la muestra en mg NO₃⁻ - N/l
- Abs_{COR} = Absorbancia de la muestra corregida (Abs₂₂₀ - 2 * Abs₂₇₅)
- b = Intercepto
- m = Pendiente de la curva de regresión

Recomendaciones

Si el valor de corrección es 10% mayor que la lectura a 220 nm no utilice este método.

4.7 Diagrama de flujo



4.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 4-114 pp.

5. Determinación del fósforo reactivo

El fósforo se encuentra en el agua en una diversidad de formas disueltas y particuladas. En el mar, los iones fosfato junto con los nitritos, son factor limitante para el crecimiento del plancton en los océanos.

Todos los métodos para evaluación de iones fosfato en agua de mar dependen de la formación de un complejo de fosfomolibdato y de la subsiguiente reducción a un compuesto azul, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente. La diferencia entre los diferentes métodos se basa en la utilización del reactivo reductor, algunos autores utili-

zan solución de cloruro estañoso y otros ácido ascórbico.

El método del ácido ascórbico fue desarrollado por Murphy y Riley (1952) y es el recomendado por Strickland & Parsons (1972) y FAO (1975). Este método es superior al del cloruro estañoso porque el error por la salinidad es insignificante y el color desarrollado por el complejo es más estable y ha sido adoptado por la mayoría de laboratorios oceanográficos.

Los iones fosfato del agua de mar se hacen reaccionar con una solución compuesta que contiene ácido molíbdico, ácido ascórbico y antimonio trivalente que actúa como catalizador, en condiciones tales que se obtiene un pH ácido donde no hay posibilidades de formación del complejo silicomolibdato, eliminando así esta interferencia. El heteropoliácido complejo resultante se reduce *in situ* para dar una coloración azul, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 885 nm en celda de 10 mm.

Alcance y aplicación

Este método puede ser aplicado a aguas naturales, salinas, como también a las de origen doméstico e industrial. Con un buen espectrofotómetro y bajos blancos puede discriminarse una absorbancia de 0.002, lo que implica que la cantidad más pequeña de fosfato que se puede detectar en forma directa es de $0.03 \mu\text{moles/l}$ (usando celda de 10 cm). Las absorbancias mantienen proporcionalidad respecto de la concentración hasta los $28 \mu\text{moles/l}$, lo que equivale a una absorbancia neta de aproximadamente 0.630 en una celda de 1 cm. El rango usual de concentración de fosfato en el agua de mar es de 0.03 a $5 \mu\text{moles/l}$.

5.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

5.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS con rango espectral de 400-900 nm

Celdas de vidrio de 1 ó 10 cm de paso óptico

Viales de 40 ml

Dosificadoras o pipetas de 1 y 2 ml

Probetas de 100 y 50 ml

Vasos de precipitado de 200 y 50 ml

Balones aforadas de diferentes capacidades

5.3 Reactivos

Solución heptamolibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$: Disolver 15 g de heptamolibdato de amonio grado analítico en agua destilada y completar a 500 ml, almacenar en botella plástica o de vidrio lejos de luz. La solución es estable por varias semanas.

Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4): Mezclar 70 ml de ácido sulfúrico concentrado ($d=1.82 \text{ g/ml}$) con 450 ml de agua destilada. Dejar enfriar y almacenar en recipiente de vidrio.

Solución de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$): Disolver 10.8 gramos de ácido ascórbico en 200 ml de agua desionizada. Almacenar la solución en recipiente plástico protegido de la luz y congelar. Descongelar para uso y recongelar nuevamente. En estas condiciones la solución es estable durante semanas.

Solución de tartrato de potasio antimonio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KO}_7\text{Sb}$): Disolver 0.34 g de reactivo analítico en 250 ml de agua destilada. Si es necesario, calentar moderadamente en plancha. Almacenar bajo refrigeración en recipiente de plástico o vidrio. La solución es estable durante meses.

Reactivo mixto: Mezclar en su orden 20 ml de solución de molibdato, 50 ml de solución de ácido sulfúrico, 20 ml de solución de ácido ascórbico y 10 ml de solución de tartrato de Sb-K; esta solución se prepara diariamente, es estable por cuatro horas.

Solución estándar de fosfato. Disolver 0.1361 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) (previamente seco a 104°C por dos horas), en 100 ml de agua destilada almacenar en una botella oscura con $50 \mu\text{l}$ de cloroformo. Esta solución tiene una concentración de $10000 \mu\text{g.at/l}$ y es estable por varios meses.

5.4 Procedimiento

- Depositar en los viales de reacción, 25 ml de cada muestra de agua filtrada
- Recordar que con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra estándar de $3.0 \mu\text{g at P/l}$

- Agregar a cada vial 2.5 ml del reactivo mixto. Mezclar para que se verifique la reacción, y cubrir el erlenmeyer con papel aluminio para evitar contaminación
- Dejar en reposo 5 minutos
- Seleccionar la longitud de onda 885 nm
- Seguidamente, registrar la absorbancia de cada una de las muestras, el estándar de trabajo y el blanco de reactivos

Determinación del blanco

Usar agua destilada en lugar de muestra y llevar a cabo los pasos descritos anteriormente para obtener la absorbancia del blanco de reactivos.

5.5 Calibración

- Stock secundario. Medir 1.0 ml de la solución estándar y llevar a 100 ml con agua desionizada; la concentración de esta nueva solución es de 100 $\mu\text{mol/l}$.
- Tomar 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 ml de la solución secundaria y completar a 25 ml, con agua desionizada en balones aforados; las concentraciones de estas soluciones son 1.0 , 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu\text{g.at.P/l}$ respectivamente, o seleccionar concentraciones que estén en el rango de trabajo de las muestras.
- Aplicar el proceso descrito para la muestra y el blanco

Aplique una regresión lineal a los resultados y calcule la concentración de la siguiente forma. Determine la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración. $[Y = mX+b]$.

$$\text{Abs} = C * m + b$$

Y = Abs = Valor de la absorbancia del estandar
 X = C = Concentración del estandar en $\mu\text{g.at P/l}$
 b = Intercepto

5.6 Cálculos

De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, así:

$$C = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

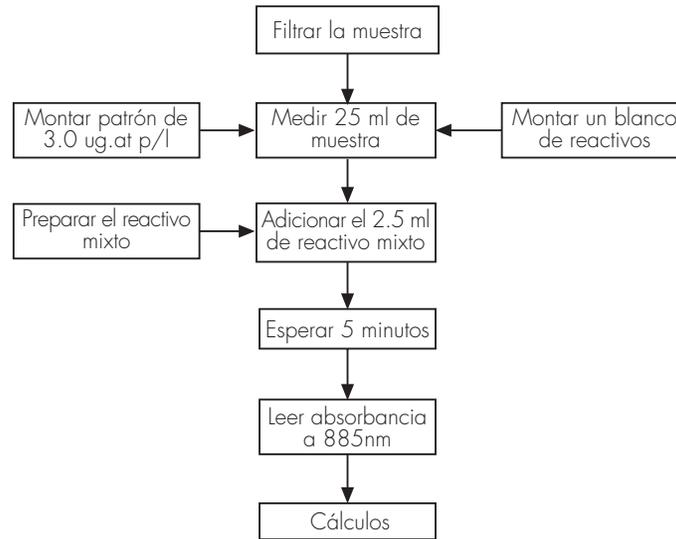
C = Concentración de la muestra en $\mu\text{g.at.P/l}$
 Abs = Absorbancia de la muestra corregida (menos la absorbancia del blanco)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

Recomendaciones

Leer entre 10 y 30 minutos después de haber adicionado el reactivo. Corregir la absorbancia con el blanco de reactivos (medir la turbidez, si es necesario).

La limpieza de los recipientes de vidrio es muy importante. No deben utilizarse detergentes comerciales que contengan fosfatos. Lavar el material con ácido clorhídrico diluido al 5% y enjuagar varias veces con agua destilada.

5.7 Diagrama de flujo



5.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Murphy, J. y J.P. Riley. 1952. A Modified Single Solution Method for the Examination on Phosphate in Natural Water. Anal. Chim. Acta.

Rodier, J.1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Otawa.

6. Determinación de silicato (método del metol)

El agua de mar contiene un amplio espectro de materiales silíceos muy pequeños en suspensión; muchos de ellos se han producido a partir de actividades geológicas y son transportados al mar por los ríos o por el viento. En general, el sílice puede estar tanto en solución como en forma particulada.

Todos los métodos para evaluación de iones silicato dependen de la producción del complejo silicomolibdato y su posterior reducción a un compuesto azul, cuya intensidad es medida espectrofotométricamente. La diferencia radica en la utilización del reactivo reductor.

El método del metol fue desarrollado por Mullín & Riley (1955), y modificado por Strickland & Parsons (1972). En la actualidad es el más utilizado, porque el complejo resultante es estable en el tiempo, y además es económico.

Los iones silicato del agua de mar se hacen reaccionar con molibdato de amonio, de tal manera que se forman los complejos silicomolibdato, fosfomolibdato y arsenomolibdato. A la solución resultante se le agrega metol (p-metil-amino-fenol-sulfato) y ácido oxálico, los cuales reducen el complejo silicomolibdato dando como resultado un compuesto azul que simultáneamente descompone cualquier fosfomolibdato o arsenomolibdato, de manera que se eliminan las interferencias por fosfatos y arsenatos. La absorbancia de la solución resultante se mide por espectrofotometría a 810 nm en celda de 10 mm.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a silicato reactivo en todo tipo de aguas naturales, especialmente de mar, también para desechos domésticos e industriales.

La mínima concentración de silicatos, expresada como Si, que se puede detectar utilizando celda de 10 mm es de 0.05 $\mu\text{g-at/L}$, que es equivalente a 1.4 $\mu\text{g/L}$ de Si.

6.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

6.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS con rango espectral de 400-900 nm

Celdas de vidrio de 1 ó 10 cm de paso óptico

Balones aforados de diferentes capacidades preferiblemente plásticos

Viales plásticos de 40 ml con tapa

Dosificadores o pipetas de 1, 2 y 5 ml

Vasos de precipitado de 100 y 50 ml

Probetas de 100 y 50 ml

6.3 Reactivos

Solución de metol-sulfito: Disolver 6.0 g de sulfito de sodio anhidro (Na_2SO_3) en 500 ml de agua destilada y añadir 10 g de metol (p-metil-amino-fenol-sulfato - $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$), disolver y filtrar la solución en papel Whatman # 1; guardar en frasco plástico.

Solución de ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$): Disolver 50 g de ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) R.A. en 500 ml de agua destilada. Almacenar en frasco plástico, dejando decantar los cristales. La solución es estable por varios meses.

Acido sulfúrico 50%: Mezclar 250 ml de ácido sulfúrico concentrado con 250 ml de agua destilada. Dejar enfriar y almacenar en recipiente de polietileno.

Solución de heptamolibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$: Disolver 4.0 g de reactivo analítico en 300 ml de agua destilada, adicionar 12 ml de HCl concentrado y completar a 500 ml. Almacenar en recipiente plástico y lejos de la luz. Descartar la solución cuando se observe formación de precipitado blanco. La solución es estable durante varias semanas.

Reactivo reductor: Mezclar 100 ml de solución de metol-sulfito, 60 ml de solución de ácido oxálico, 60 ml de ácido sulfúrico y completar a 300 ml con agua destilada. Este reactivo se prepara diariamente.

Solución estándar de silicatos: Pesar 0.1880 g de silico-fluoruro de sodio (Na_2SiF_6), previamente secado a 105 °C, disolver en 100 ml de agua

desionizada y completar a un litro. Inmediatamente, trasvase en botellas de polietileno, la solución es estable por varios meses y contiene 10000 µg.at.Si/l.

6.4 Procedimiento

- Adicionar 10 ml de solución de molibdato a un erlenmeyer
- Agregar 25 ml de muestra filtrada y mezclar bien, dejar en reposo durante 15 minutos
- Adicionar 15 ml de la mezcla reductora y agitar inmediatamente
- Dejar la solución en reposo durante 2 horas para total reducción
- Medir la absorbancia a 810 nm de cada una de las muestras, el estándar de trabajo de 10.0 µg.at Si/l y el blanco de reactivos

Determinación del blanco

Usar agua desionizada que haya sido colectada en botellas de polietileno en lugar de las muestras para determinar la absorbancia del blanco.

6.5 Calibración

- Stock secundario: Diluir 1.0 ml de la solución estándar a 100 ml en agua desionizada. Su concentración equivale a 100 µmoles/l
- Medir 0.25, 1.25, 2.50, 3.75 y 5.00 ml de la solución secundaria y completar a 25 ml con agua desionizada en balones aforados; las concentraciones de estas soluciones son 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 µg.at.Si/l respectivamente, o seleccionar concentraciones que estén en el rango de trabajo de las muestras

- Aplicar el proceso descrito para la muestra y el blanco

Aplicar una regresión lineal a los resultados y calcular la concentración de la siguiente forma: Determinar la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración. [Y = mX+b].

$$\text{Abs} = C * m + b$$

Y = Abs = Valor de la absorbancia del estandar
X = C = Concentración del estandar en µg.at Si/l
b = Intercepto

6.6 Cálculos

De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, así:

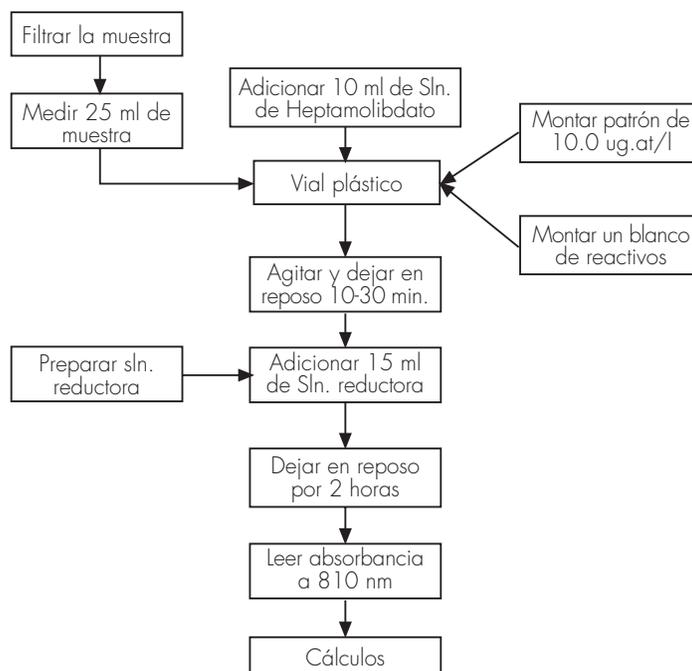
$$C = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

C = Concentración de la muestra en µg.at.Si/l
Abs = Absorbancia de la muestra corregida (menos la absorbancia del blanco)
b = Intercepto
m = Pendiente de la curva de regresión

Recomendaciones

Normalmente la reacción se completa en 1 hora, excepto cuando se encuentran altos valores de silicatos. Las soluciones pueden medirse hasta en 6 horas.

6.7 Diagrama de flujo



6.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Mullin, J.B. y J.P. Riley. 1955. The Colorimetric Determination of Silicate with Special Reference to sea and Natural Water. Anal. Chem. Acta 12: 162-176.

Rodier, J. 1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

7. Determinación de silicato (método de Koroleff)

En el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR para la determinación de silicatos se sigue actualmente una modificación del método del Metol (ver numeral 6); la modificación dada por Koroleff (1971), utiliza en el proceso analítico ácido ascórbico como reductor. Básicamente, los iones silicatos presentes en la muestra de agua filtrada se hacen reaccionar con molibdato de amonio, formándose complejos amarillos de silicomolibdato, fosfomolibdato y arsenomolibdato. Seguidamente se elimina la interferencia debida a los dos últimos complejos y finalmente se reduce con ácido ascórbico el complejo silicomolibdato, a un complejo azul, cuya absorbancia se mide a 810 nm utilizando celda de 10 mm para aguas costeras y estuarinas y celda de 100 mm para aguas de mar abierto.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a silicato reactivo en todo tipo de aguas naturales, especialmente marinas, también para desechos domésticos e industriales.

La mínima concentración de silicatos, expresada como Si, que se puede detectar utilizando celda de 10 mm es 1.0 µg-at/L, que es equivalente a 1.4 µg/L de Si.

7.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 1.1.

7.2 Materiales y equipos

Ver numeral 6.2.

7.3 Reactivos

Acido sulfúrico 7.2 N: A 200 ml de agua desionizada agregar con cuidado 50 ml del ácido concentrado. Dejar enfriar y almacenar en recipiente de polietileno

Solución de heptamolibdato de amonio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O]: Disolver 50 gramos del reactivo en 100 ml de agua desionizada, luego diluir a 250 ml con agua desionizada y almacenar en recipiente plástico protegido de luz directa. Descartar la solución cuando se observe formación de precipitado blanco. La solución es estable durante varias semanas.

Solución de ácido oxálico (C₂H₂O₄): Disolver 25 gramos del reactivo puro en 250 ml de agua desionizada. Almacenar en recipiente plástico. La solución es estable durante varios meses.

Solución de ácido ascórbico: Disolver 4.375 gramos del reactivo en 250 ml de agua desionizada. Almacenar congelado en recipiente de polietileno. Descongelar solamente al momento de uso. La solución es útil mientras permanezca ligeramente amarilla.

Reactivo Mixto: Agregar directamente en un recipiente plástico, 50 ml de solución de heptamolibdato a 50 ml de ácido sulfúrico 7.2 N (no agregar el ácido al molibdato). La solución es estable durante varios meses.

Solución estándar de silicatos: Pesar 0.1880 g de silico-fluoruro de sodio (Na₂SiF₆), previamente secado a 105 °C, disolver en 100 ml de agua desionizada y completar a un litro. Inmediatamente, trasvasar en botellas de polietileno. La solución es estable y contiene 10000 µg.at Si/l.

7.4 Procedimiento

- Depositar en los viales plásticos, 25 ml de la muestra de agua filtrada
- Adicionar 0.7 ml del reactivo mixto, mezclar y dejar en reposo entre 10 y 20 minutos
- Agregar 0.7 ml de ácido oxálico y agitar
- Agregar 0.7 ml de ácido ascórbico, mezclar bien y dejar en reposo 30 minutos
- Seleccionar una longitud de onda de 810 nm en el espectrofotómetro
- Seguidamente, registrar la absorbancia de cada una de las muestras, el estándar de trabajo de 10.0 µg.at Si/l y el blanco de reactivos

Determinación del blanco

Usar agua desionizada que haya sido colectada en botellas de polietileno en lugar de las muestras y llevar a cabo el procedimiento.

7.5 Calibración

El proceso de calibración es idéntico al descrito en el numeral 6.5.

C = Concentración de la muestra en $\mu\text{g.at./l}$
 Abs = Absorbancia de la muestra corregida (menos la absorbancia del blanco)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

7.6 Cálculos

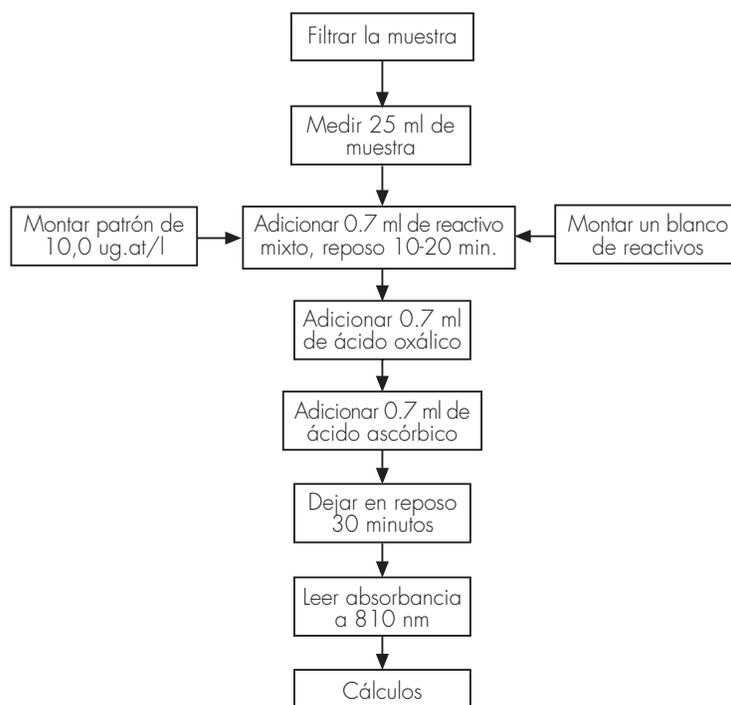
De la curva de calibración se obtiene directamente la concentración de la muestra, así:

$$\text{Abs} = C * m + b$$

Recomendaciones

Normalmente la reacción se completa en una hora, excepto cuando se encuentra altos valores de silicatos. Las soluciones pueden medirse hasta en 6 horas.

7.7 Diagrama de flujo



7.8 Bibliografía

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. 1993. Manual de técnicas analíticas de parámetros físico-químicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena.

Grasshoff, Klaus, et al. 1976. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim. New York. 149 pp.

8. Determinación del nitrógeno total (NTK)

El nitrógeno Kjeldahl es definido como la suma de amonio libre y compuestos orgánicos nitrogenados que son convertidos a una sal de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), después de la digestión de la muestra en medio ácido y en presencia de un catalizador. El amonio es destilado en medio alcalino y recuperado nuevamente para su cuantificación.

El nitrógeno Kjeldahl orgánico es la diferencia obtenida substrayendo el amonio libre del valor del nitrógeno Kjeldahl total. El origen del nitrógeno orgánico puede ser natural o industrial como desechos alimenticios, farmacéuticos de productos peptídicos, colorantes, etc. Para la ingeniería sanitaria es muy importante el contenido de nitrógeno de origen orgánico, ya que indica el grado de contaminación de la masa de agua.

En principio la presencia de H_2SO_4 , sulfato de potasio (K_2SO_4), y sulfato de cobre (CuSO_4), como catalizador, convierten el nitrógeno amino de cualquier material orgánico a amonio. El amoniaco liberado también es convertido a amonio, después se adiciona base y el amoniaco es destilado del medio alcalino y absorbido en ácido bórico o sul-

fúrico. El amonio liberado puede ser determinado colorimétricamente, por electrodo amonio-selectivo o por titulación con una solución estándar de ácido (APHA, 1998).

Una de las interferencias que presenta el proceso de digestión es el contenido de sales y sólidos inorgánicos en la muestra. El contenido de ácido y sal del reactivo de digestión Kjeldahl tienen la intención de producir una temperatura cercana a 380°C . Si la muestra contiene una cantidad muy grande de sales o sólidos inorgánicos que se disuelvan durante la digestión, la temperatura puede elevarse sobre 400°C , punto en el cual empieza a presentarse una pérdida pirolítica de nitrógeno. Para prevenir una temperatura de digestión excesiva se debe mantener el balance ácido - sal.

El contenido de materia orgánica (MO) también puede provocar interferencias; durante la digestión el ácido sulfúrico oxida la MO a CO_2 y agua. Si está presente una gran cantidad de materia orgánica, se consumirá gran parte del ácido, incrementando la relación de sal a ácido, con el consiguiente incremento de la temperatura de digestión y si el contenido es muy elevado, la temperatura puede ascender sobre 400°C , resultando en la pérdida pirolítica del nitrógeno.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas, teniendo en cuenta las interferencias que se mencionaban anteriormente. También se puede utilizar para la determinación en sedimentos y organismos.

Parte de la precisión del método está muy relacionada con la determinación final del amonio. La sensibilidad de los métodos colorimétricos los hace particularmente útiles para determinar niveles de nitrógeno orgánico inferiores a 5 mg/l . La titula-

ción y los métodos de electrodo selectivo para la medición del amonio son utilizados en un rango más amplio de concentración de nitrógeno orgánico.

8.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

En muestras de sedimento la recolección se hace con draga o corazonador, se transfiere con cuchara de hierro inoxidable o plástica a un contenedor hecho de papel aluminio. Si el análisis no se realiza inmediatamente, es preciso congelar la muestra a una temperatura de -20°C .

Para muestras de agua se sigue el procedimiento dado en el numeral 1.1 pero sin filtrarla; los resultados son más significativos en muestras frescas, si no es posible el análisis inmediato preservarla acidificando a pH menor a 2 con H_2SO_4 concentrado y almacenar refrigerada a 4°C .

8.2 Materiales y equipos

Equipo de digestión con sistema de recolección de gases
Equipo de destilación con flujo de vapor
Equipo titulador
pH-metro
Erlenmeyers de 250 ml
Vasos de precipitado

8.3 Reactivos

Agua destilada y desionizada: Exenta de amonio (recién obtenida).

Reactivo de digestión: Disolver 134 g de K_2SO_4 y 7.3 g de CuSO_4 en cerca de 800 ml de agua. Cui-

dadosamente agregar 134 ml de H_2SO_4 concentrado. Cuando se haya enfriado hasta temperatura ambiente, diluir la solución a 1 L con agua. Mezclar bien y mantener a una temperatura cercana a 20°C para prevenir la cristalización.

En el mercado se consiguen tabletas de digestión Kjeldahl, si se utilizan estas tabletas el reactivo de digestión es reemplazado y a la muestra se le agrega sólo 15-20 ml de H_2SO_4 concentrado y 1 ó 2 tabletas.

Hidróxido de sodio 6N: Diluir 240 g en agua y completar 1 l.

Solución tampón de borato: Agregar 88 ml de solución de NaOH 0,1 N a 500 ml de solución de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) aproximadamente 0,025 M (9.5 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{l}$) y diluir a 1 litro.

Solución de ácido bórico (H_3BO_3): Disolver 20 g de reactivo analítico en agua, y diluir a 1 l.

Solución indicadora de ácido bórico: Disolver 20 g de H_3BO_3 en agua, agregar 10 ml de la solución indicadora mixta y diluir a 1 l. Preparar mensualmente.

Solución indicadora mixta: Disolver 200 mg de indicador rojo de metilo en 100 ml de alcohol etílico del 95%. Disolver 100 mg de azul de metileno en 50 ml de alcohol etílico del 95%. Combinar las soluciones. Preparar mensualmente.

Solución titulante de ácido sulfúrico 0,02N: Preparar una solución de H_2SO_4 0.1N diluyendo 3 ml de H_2SO_4 concentrado a 1 l con agua destilada libre de CO_2 . Diluir 200 ml de esta solución a 1l con agua destilada. Estandarizar el ácido 0,02N contra una solución de Na_2CO_3 0,0200 N (1,060 g de Na_2CO_3 anhidro secado a 140°C , diluido a 1000 ml con agua destilada).

8.4 Procedimiento

Seleccionar el volumen de muestra de la tabla siguiente:

Nitrógeno orgánico en la muestra, mg/l	Volumen de muestra, ml
4-40	50.0
8-80	25.0
20-200	10.0
40-400	5.0

Para muestras de lodos y sedimentos, pesar una porción de muestra húmeda que contenga entre 0.2 y 2 mg de nitrógeno orgánico en un crisol o en un pesasustancias. Transferir la muestra al tubo de digestión diluyendo y enjuagando el recipiente de pesaje varias veces con pequeñas cantidades de agua. Hacer esta operación con la cantidad más pequeña posible de agua, sin exceder un volumen de 50 ml.

Determinar a una submuestra el contenido de humedad.

Digestión

- Cuidadosamente agregar 10 ml de reactivo de digestión al balón Kjeldahl que contiene la muestra
- En muestras marinas el contenido de sal puede afectar negativamente el análisis, por lo cual es recomendable la adición de ácido extra (aprox. 10 ml)
- Agregar 4 perlas de ebullición para prevenir sacudidas durante la digestión. Ajustar cada unidad de calentamiento en el aparato de digestión Kjeldahl
- Calentar bajo una campana de extracción o con equipo de remoción de gases
- Continuar la ebullición vigorosa hasta que la

solución se haga transparente y verde pálida y se observen copiosos vapores

- Calentar al máximo y digerir por 30 minutos adicionales

Destilación

- Enfriar y transferir el tubo con la muestra digerida al equipo de destilación
- Diluir la muestra digerida con agua destilada hasta aproximadamente 50 ml de volumen total
- Adicionar solución de hidróxido de sodio para neutralizar la muestra digerida hasta obtener un viraje de color claro a oscuro (50 ml son suficientes)
- En un erlenmeyer medir entre 50 y 75 ml de solución de ácido bórico y si desea, adicionar 2 ó 3 gotas de indicador mixto. Colocar el erlenmeyer en el destilador de nitrógeno por debajo del tubo de salida del destilado. Asegurar que la punta del condensador esté totalmente sumergida dentro del ácido bórico
- Destilar la muestra hasta obtener un volumen de 150 a 200 ml aproximadamente. La presencia de amoníaco cambia el color de la solución de ácido bórico de azul a verde, cuando se ha empleado el indicador

Determinación del amoníaco

Método acidimétrico o titulométrico:

- Ajustar el volumen del destilado a 250 ml
- Titular el amoníaco en el destilado con el estándar de H_2SO_4 0.02N hasta que el indicador cambie a un color lavanda pálido

Método del indofenol:

La determinación del amoníaco destilado también se puede realizar mediante el método del azul de

indofenol (ver numeral 1), pero el destilado se debe recoger sobre una solución diluida de ácido sulfúrico; este método es aplicable para concentraciones por debajo de 1 mg N/l.

8.5 Calibración

Durante todo el proceso se debe llevar un blanco de reactivos y un estándar de concentración conocida de fenilamina para determinar el rendimiento y porcentaje de recuperación del método. Si la cuantificación final del amoníaco se hace por el método del indofenol, se debe seguir el procedimiento descrito en el numeral 1.5.

8.6 Cálculos

Si la cuantificación final del amoníaco se hace por el método del indofenol, se debe seguir el procedimiento descrito en el numeral 1.6. Si se sigue el método titulométrico o acidométrico (aplicable para concentraciones superiores a 1 mg N/l), la concentración de nitrógeno se obtiene como:

Muestras líquidas:

$$\text{mg N /l} = \frac{(A - B) * 280}{\text{ml muestra}}$$

Muestras sólidas (sedimentos, organismos, lodos):

$$\text{mg N /kg} = \frac{(A - B) * 280}{\text{g muestra seca}}$$

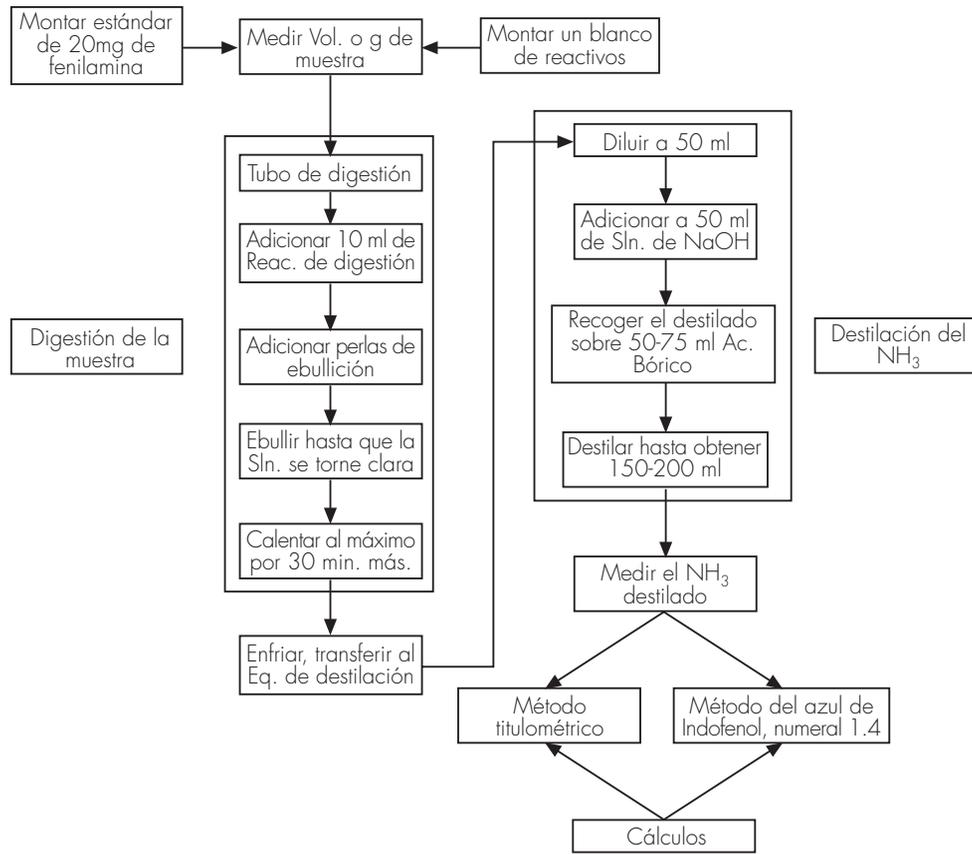
A = Volumen de H₂SO₄ 0.02 N gastado en la titulación de la muestra (ml)

B = Volumen de H₂SO₄ 0.02 N gastado en la titulación del blanco (ml)

Recomendaciones

- El proceso convierte los componentes nitrogenados de origen biológico tales como aminoácidos, proteínas y péptidos a amonio, más no convierte los compuestos nitrogenados de algunos desechos industriales como nitrocompuestos, hidrazas, oximas, semicarbazonas y algunas aminas terciarias
- El método es muy susceptible a la contaminación, la digestión, destilación y análisis de amonio deben ser hechos en un ambiente exento de vapores amoniacaes
- Durante la destilación es preciso controlar la rata de generación de vapor para ebulir el contenido de destilación de tal manera que no ocurra escape de vapor en la salida del condensador ni tampoco burbujeo del contenido del erlenmeyer receptor
- Mantener la relación sal - ácido en el tubo de digestión para prevenir la pérdida de nitrógeno por el sobrecalentamiento (superior a 400°C)

8.7 Diagrama de flujo



8.8 Bibliografía de consulta

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 4-124 pp.

ASTM,1994. American Society for Testing and Materials. Method D3590. Philadelphia.

9. Determinación del fósforo total

El fósforo es un nutriente esencial para la productividad de un sistema acuático. En los sistemas riparios la mayor parte de este se encuentra en

forma particulada, el cual al contacto con el agua marina y debido a los cambios químicos que se generan, se precipita quedando sólo la fracción disuelta para ser utilizada por los organismos vivos (Kiely, 1999).

Como el fósforo se presenta en combinación con la materia orgánica, debe disponerse de un método de digestión que garantice la liberación del fósforo como ortofosfato para permitir la cuantificación del fósforo total. Existen tres métodos de digestión: (a) Con ácido perclórico, (b) Con ácido sulfúrico – ácido nítrico y (c) Con persulfato. De estos métodos la digestión con ácido perclórico es la más fuerte, por lo cual es la que ha adoptado el INVEMAR.

Alcances y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, en especial a las marinas. Su precisión viene dada por el método empleado para la determinación de la concentración de iones PO_4^{3-} liberados.

9.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Para muestras de agua se sigue el procedimiento dado en el numeral 1.1, pero sin filtrarla.

9.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS con rango espectral de 400-900 nm
Celdas de vidrio de 1 ó 10 cm de paso óptico
Viales de 40 ml
Dosificadoras o pipetas de 1 y 2 ml
Probetas de 100 y 50 ml.
Plancha de calentamiento
Campana de extracción
Vasos de precipitado de 200 y 50 ml
Balones aforados de 50 ml
Erlenmeyers de 125 ml
Vidrios de reloj
Autoclave con capacidad de desarrollar 98 a 137 KPa
Cuchara de vidrio o espátula de porcelana para la adición de cristales de persulfato

9.3 Reactivos

Además de los reactivos utilizados para la determinación de fosfatos (ver numeral 5.3.), se requieren los siguientes:

Acido perclórico concentrado (70%)

Acido clorhídrico concentrado

Solución de hidróxido de sodio 4N: Disolver 40.0 g en 100 ml de agua desionizada, dejar enfriar y completar a 250 ml.

Solución indicadora de fenolftaleína al 1%: Pesar 1.0 g de fenolftaleína y disolver a 100 ml con agua desionizada.

Solución de hidróxido de sodio 1 N.

Solución de ácido sulfúrico: Cuidadosamente adicionar 30 ml de H_2SO_4 concentrado a aproximadamente 600 ml de agua desionizada y completar a 1000 ml.

Persulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, o persulfato de potasio $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en cristales.

9.4 Procedimiento

9.4.1 Digestión con ácido perclórico

- Adicionar a un erlenmeyer de 125 ml, 50 ml de muestra sin filtrar
- Agregar 3 ml de ácido perclórico concentrado y agitar
- Someter a calentamiento en una plancha para llevar a cabo la digestión de la materia orgánica
- Cuando se desprendan vapores blancos del ácido perclórico, disminuir la temperatura y cubrir con un vidrio de reloj, dejar por 10 minutos en estas condiciones
- Disminuir la temperatura y dejar enfriar
- Agregar 3 ml de ácido clorhídrico y calentar nuevamente
- Cuando queden aproximadamente 5 ml de muestra, apagar la plancha y dejar enfriar

- A la muestra fría, agregar 2 gotas de solución indicadora de fenolftaleína
- Neutralizar la solución mediante la adición de NaOH 4N, llevar hasta una coloración ligeramente rosada
- Ajustar el volumen de la muestra a 25 ml y proceder a la determinación de los fosfatos siguiendo el procedimiento del numeral 5.4
- Es necesario montar con cada set de muestras un blanco de reactivos y un estándar de 1.5 $\mu\text{g.at P/l}$

9.4.2 Digestión con persulfato

Un procedimiento alternativo a la digestión con ácido perclórico y muy fácil de aplicar es el siguiente:

- Agitar fuertemente y tomar 50 ml de muestra sin filtrar
- Adicionar 0.05 ml (1 gota) de solución indicadora de fenolftaleína, si aparece un color rojo adicionar gota a gota solución de H_2SO_4 hasta que desaparezca
- Agregar 1 ml de solución de H_2SO_4 y 0.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, ó 0.5 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Someter a calentamiento por 30 minutos en un autoclave a 98 - 137 Kpa
- Enfriar y agregar una gota de solución indicadora de fenolftaleína y neutralizar mediante la adición de NaOH 1N, llevar hasta una coloración ligeramente rosada

- Ajustar el volumen de la muestra a 100 ml y proceder a la determinación de los fosfatos siguiendo el procedimiento del numeral 5.4

9.5 Calibración

La calibración del método para la determinación de los fosfatos liberados durante la digestión se hace de acuerdo con el numeral 5.5.

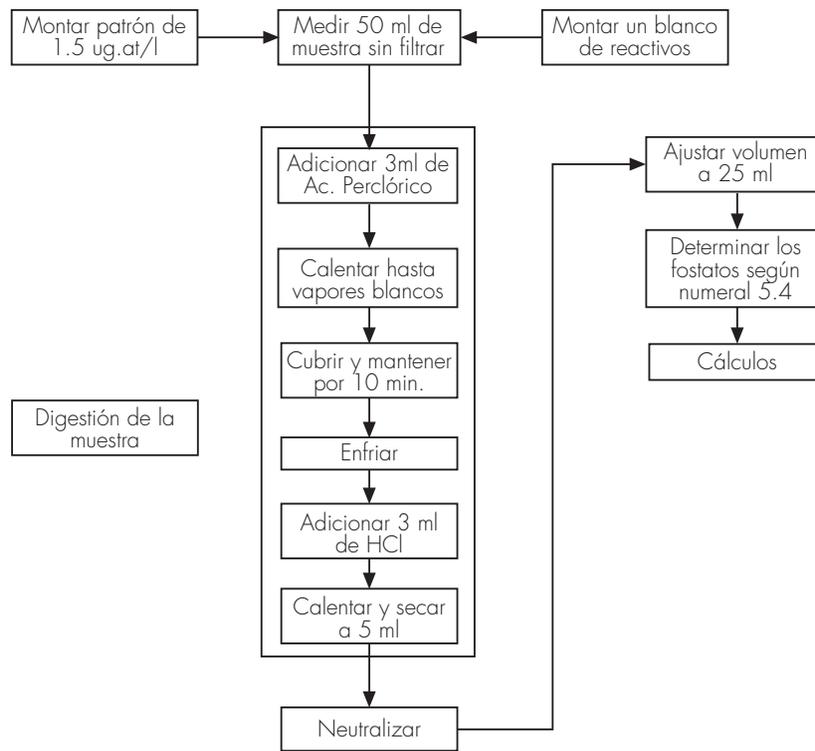
Es necesario verificar el proceso de digestión y cuantificación de la muestra, para ello se utiliza una solución estándar de fosfato de concentración conocida (1.5 $\mu\text{g.at P/l}$), la cual se somete a todos los pasos del proceso y se determina la concentración. Este mismo estándar sirve para controlar el método, llevando el registro a través de cartas de control.

9.6 Cálculos

La determinación de fósforo total como $\mu\text{g.at P/l}$ se hace de la lectura final de iones fosfatos liberados después de haber sometido la muestra a un proceso de digestión. Por esta razón, para calcular la concentración de fósforo se sigue el procedimiento descrito en el numeral 5.6.

Es necesario recordar que, si se llevó a digestión una muestra de 50 ml y para la determinación de los fosfatos se ajustó el volumen a 25 ml, se debe dividir la concentración obtenida por dos.

9.7 Diagrama de flujo



9.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 4-142 pp.

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

OXÍGENO DISUELTTO Y CLOROFILAS

1. Determinación de oxígeno disuelto (método Winkler)

El oxígeno (O_2) procedente de la atmósfera se disuelve directamente en las aguas superficiales, o se genera mediante la fotosíntesis en las capas superiores iluminadas. Con el aumento de la profundidad, el O_2 disminuye, en parte, al ser consumido por la respiración de microorganismos y de otro lado, por la descomposición microbiana de los detritos orgánicos y por el fenómeno de absorción. Su índice de saturación en el agua de mar con una salinidad de 27.1 ‰, temperatura de 25°C y presión de 1 atmósfera, es de 7.08 mg/l (4.96 ml/l). (Ver anexo. Tabla de solubilidad del oxígeno disuelto en agua).

La vida, el crecimiento de microorganismos y el desarrollo de sus actividades metabólicas específicas, dependen de la disponibilidad de oxígeno molecular. Algunos procesos tienen lugar solamente bajo condiciones aerobias, otros en cambio, son estrictamente anaerobios.

La evaluación del oxígeno disuelto (OD) en todo sistema de agua natural, es de importancia fundamental para conocer la distribución de organismos en los océanos, para los estudios de descomposición de materia orgánica y para la de productividad de los mismos.



Bureta digital – automática utilizada para la determinación de oxígeno disuelto por el Método Winkler

Se han desarrollado varios métodos analíticos para su estimación. Los volumétricos, gasométricos y la cromatografía de gases han sido utilizados en primera instancia. En los últimos años se ha avanzado mucho en equipos electrónicos para la determinación del OD con electrodos de membrana.

El Método Volumétrico de Winkler (1888) revisado por Carpenter (1966), sigue siendo el de más utilización por parte de la comunidad de laboratorios debido a su sensibilidad, precisión y relativa sencillez. Una muestra de agua se hace reaccionar con una solución de iones manganesos y

una solución yoduro-alcalina, la cual lleva incorporado azida de sodio cuya función es la de eliminar interferencias debidas a iones oxidantes como nitritos y materia orgánica presente; al mismo tiempo que se le protege del aire para evitar la oxigenación.

Alcance y aplicación

El método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, residuales domésticas e industriales, con especial referencia al agua de mar. La exactitud global del Método Winkler es determinada por la estequiometría de la secuencia de reacciones, así como por las exactitudes de cada uno de los tratamientos y manipulaciones de las muestras. Así mismo, la calibración de los aparatos volumétricos utilizados es esencial para alcanzar una alta exactitud, existen buretas digitales que proporcionan +/- 0.01 ml de precisión.

La precisión del método, numéricamente expresada por la desviación estándar es de +/-0.02 mg/l para mediciones hechas sobre agua destilada; y cerca de +/- 0.06 mg/l en muestras de aguas de desecho y efluentes residuales (APHA, 1998).

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La muestra para determinación de oxígeno disuelto debe ser tomada de la botella muestreadora antes que cualquier otra, usando una manguera de caucho y evitando introducir burbujas de aire. La botella Winkler en la cual se colecta, debe enjuagarse por lo menos dos veces con la misma agua. La muestra se trasiega lentamente, introduciendo la manguera de caucho hasta el fondo de la botella y dejando que el agua reboce. Luego la manguera se saca lentamente.

Cuando se trata de muestras de superficie tomadas con un balde, se sumerge la botella Winkler en el balde sosteniéndola en forma oblicua, dejando que el agua escurra suavemente por las paredes y evitando las turbulencias.

En forma rápida se agregan primero 2 ml de solución de sulfato de manganeso, colocando la punta del dosificador o pipeta bajo la superficie, de modo que la salida del reactivo se ubique cerca de la base del cuello de la botella, luego 2 ml de solución yoduro-alcalina. Al agregar el segundo reactivo a la muestra, la punta del dosificador o pipeta no debe introducirse en el líquido, sino justo sobre la superficie cerca del borde del matraz, para evitar contaminación con ion manganeso. Si esta contaminación ocurriera, el manganeso (II) transferido a la botella de yoduro alcalino determinaría la formación de precipitado que obligaría a desechar el reactivo. Posteriormente se tapa y se agita fuertemente.

Las muestras se almacenan en un lugar fresco y preferiblemente oscuro, procediéndose a su traslado al laboratorio para el análisis respectivo, el cual debe realizarse en un tiempo no mayor de 12 horas. Si se emplean matraces con un embudo, que permiten un sello de agua entorno al tapón, tomando además las precauciones mencionadas, se pueden almacenar por varios días (Riley, 1975). Los errores observados son menores que 0.5%.

1.2 Materiales y equipos

Bureta electrónica o digital
 Botellas Winkler de 300 ml
 Erlenmeyers de 125 ml
 Pipetas aforadas de 1, 2 y 10 ml
 Balones aforados de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml
 Beaker de 1000 ml

Mangueras de caucho
Balde plástico de 10 l
Balanza analítica (+/- 0.0001g)

1.3 Reactivos

Sulfato de manganeso (MnSO_4): Disolver 182.5 g de sulfato de manganeso en agua destilada y completar a 500 ml.

Solución yoduro-alcalina: Disolver 125.0 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 125 ml de agua destilada. Disolver 75.0 g de yoduro de potasio (KI) en 100 ml de agua destilada. Una vez frías, mezclar las dos soluciones y agregarle 2.5 g de azida de sodio disuelta en 10 ml de agua destilada, completar a 500 ml.

Ácido sulfúrico (70%): Mezclar 350 ml de ácido sulfúrico concentrado con 150 ml de agua destilada.

Solución de almidón 3%: Disolver 3.0 g de almidón soluble en 100 ml de glicerina, calentar hasta disolución total.

Tiosulfato de sodio 1N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): Disolver 62.045 g tiosulfato de sodio en agua destilada, previamente hervida y completar 250 ml. Agregarle 0.5 ml de disulfuro de carbono (CS_2) como preservativo. A partir de ésta se prepara la de 0.01 N. Guardar en botella ámbar.

Solución estándar de yodato de potasio 0.01 N (KIO_3): Pesar exactamente 0.3567 g de yodato de potasio, previamente secado, disolver en agua destilada y completar a 1.0 l en un matraz aforado.

1.4 Procedimiento

- Fijar el oxígeno de la muestra con 2 ml de solución de sulfato de manganeso, y luego 2 ml de solución yoduro-alcalina, agitar fuertemente y dejar en reposo por 15 minutos
- Agitar fuertemente y adicionar 2 ml de solución de ácido sulfúrico, mezclar hasta la disolución del precipitado. Dejar en reposo por 10 minutos, manteniendo la botella en la oscuridad
- Tomar alícuotas de 50 ml por duplicado. Titular con solución de tiosulfato 0.01N hasta obtener color amarillo pálido. Adicionar dos gotas de solución de almidón. Seguir titulando hasta desaparición del color azul. Anotar los volúmenes de tiosulfato y promediar

1.5 Calibración

- Pipetear 2 alícuotas de 10 ml de yodato de potasio 0.01N en erlenmeyers de 125 ml
- Adicionar 40 ml de agua destilada a cada uno y agitar
- Adicionar 2 ml de solución de ácido sulfúrico y agitar
- Adicionar 2 ml de solución yoduro-alcalina y agitar
- Dejar en reposo por 15 minutos
- Titular con tiosulfato 0.01N, anotar los volúmenes y obtener el promedio de ellos (V_2)
- Determinar la verdadera normalidad del tiosulfato por:

$$N_t = \frac{10 \text{ ml} \times N_{\text{KIO}_3}}{V_2}$$

N_{KIO_3} = Normalidad del yodato de potasio (0.01N).

1.6 Cálculos

La concentración de oxígeno disuelto en las muestras, puede calcularse a partir de la ecuación:

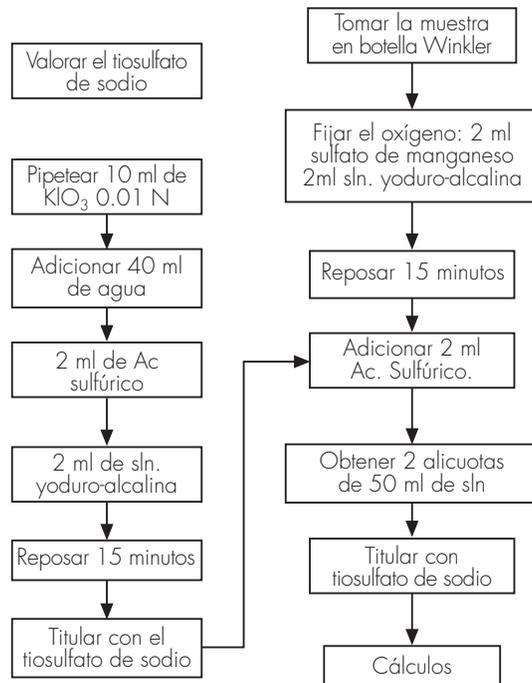
$$\text{mg OD/l} = \frac{8000 \times (V1) \times V \times N_t}{(V - 4) \times Vm}$$

Donde:

- V = Volumen del frasco (300 ml)
- V1 = Volumen de tiosulfato 0.01N gastado para titular la muestra
- Vm = Volumen de la alícuota tomada (50 ml)
- N_t = Normalidad del tiosulfato de sodio
- V -4 = Volumen corregido, teniendo en cuenta la adición de los dos primeros reactivos

Nota: Para pasar la concentración a ml/l divide la concentración en mg/l por 1.4285.

1.7 Diagrama de flujo



1.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 4-131 pp.

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros físico-

químicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Rodier, J.1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

2. Determinación de clorofilas (método Stricklan y Parson)

El método químico más útil para determinar la cantidad de fitoplancton en agua de mar es estimar la cantidad de clorofila (usualmente clorofila *a*). Estas sustancias son pigmentos que se encuentran en las plantas superiores, algas, bacterias y organismos capaces de llevar a cabo fotosíntesis. Las presentes en la naturaleza y que a la fecha han sido registradas y descritas son: clorofilas *a*, *b*, *c*, *d*, *e*.

La técnica ha sido obtenida con base en modificaciones hechas al método inicial formulado por Richards y Thompson (1952). Un volumen de agua de mar es filtrado en un filtro sintético o en uno de fibra de vidrio; los pigmentos son extraídos en acetona al 90% y su concentración es estimada espectrofotométricamente. Para alcanzar completa extracción de los pigmentos, es necesario destruir las células mecánicamente.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a la estimación de los pigmentos en aguas naturales, especialmente marinas y continentales. El límite de detección de los pigmentos vegetales en agua de mar no puede ser expresado porque depende de la cantidad de muestra filtrada. La precisión del método es del 90.0%, pero cuando la concentración de clorofilas es menor de 0.2 mg/m³ (celda 1 cm) disminuye apreciablemente.

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La colección de muestras se realiza mediante el uso de botellas muestreadoras (Niskin, Nansen),

las cuales se transfieren a un frasco plástico de 1000 ml, si es agua proveniente de zonas costeras, o a una botella de 4.0 a 5.0 litros, si es agua oceánica.

A medida que la muestra está siendo filtrada, se adicionan unas pocas gotas de suspensión de carbonato de magnesio para evitar la acidificación del filtro. Una vez ha pasado toda la muestra a través del filtro, este se retira. Si el análisis no puede realizarse inmediatamente, el filtro se coloca en un desecador a -20 °C hasta por 30 días. Los filtros pueden ser doblados a la mitad, cubiertos con papel y asegurados con un gancho para su almacenamiento.

2.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS
Celdas de 1 ó 10 cm de paso óptico
Set de filtros con sus accesorios
Filtro Millipore RAWP 0.47µm, 47 mm o de fibra de vidrio
Balones aforados de 100 ml
Homegenizador
Centrífuga

2.3 Reactivos

Suspensión de carbonato de magnesio: Pesar 1.0 g de carbonato de magnesio reactivo analítico y vertirlo en 100 ml de agua destilada. Agitar fuertemente antes de usarlo y dispensar unas pocas gotas desde un frasco lavador de 100 ml.

Solución de acetona al 90%: Agregar a 20 ml de agua a 180 ml de acetona grado reactivo para análisis. El reactivo puede ser convenientemente almacenado en una botella de vidrio.

2.4 Procedimiento

Preparación de la muestra

- Filtrar la muestra y adicionar unas pocas gotas de suspensión de carbonato de magnesio para evitar la acidificación del filtro
- Almacenar en refrigerador a -20°C

Tratamiento de la muestra

- Colocar el filtro en un vial, cubrirlo con 2 - 3 ml de solución acuosa de acetona al 90% y macerar con el homogenizador
- Enjuagar el homogenizador y ajustar el volumen total a un nivel constante, 5 - 10 ml. Mantener las muestras toda la noche en la oscuridad
- Clarificar el extracto centrifugando los tubos tapados por 10 minutos a 1000 rpm. Decantar el extracto clarificado a un tubo de centrifuga limpio de 15 ml y medir el volumen total del extracto
- Transferir el extracto a una celda de 1 cm y medir la densidad óptica (DO) a 750, 663, 645 y 630 nm. Seleccionar una dilución que dé a 663 nm una DO mayor que 0.2 y menor que 1.0. Las lecturas a 663, 645 y 630 nm también sirven para la determinación de clorofilas *b* y *c*. La lectura a 750 nm sirve como una correc-

ción para turbidez. Sustraer esta lectura de cada uno de los valores de densidad óptica de las otras longitudes de onda antes de usarlos en las ecuaciones de cálculo

2.5 Cálculos

Calcular la cantidad de clorofila *a* en cada extracto utilizando los valores de OD corregidos en la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila } a = \text{Cla} = 11.64(\text{DO}_{663}) - 2.16(\text{DO}_{645}) + 0.10(\text{DO}_{630})$$

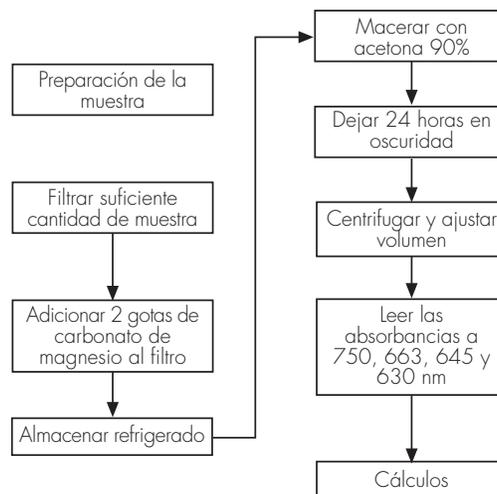
La concentración de Cla en el agua de mar se determina por medio de la siguiente fórmula:

$$[\text{Cla}], \text{ mg/m}^3 = \frac{\text{Cla} \times \text{Volumen del extracto (ml)}}{\text{Volumen de muestra (l)}}$$

Recomendaciones

Almacenar los filtros de las muestras congelados en un desecador y en la oscuridad, en caso de no poder realizar la extracción inmediatamente. Usar vidriería limpia y libre de ácidos.

2.6 Diagrama de flujo



2.7 Bibliografía de consulta

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

3. Determinación de clorofila "a" y feopigmentos (método de Lorenzen)

Los pigmentos fotosintéticos presentes en el agua se extraen con acetona acuosa (90%) y se registra su absorbancia a 665 nm, antes y después de acidificar la muestra. Este procedimiento tiene la ventaja de ser más rápido por requerir menos lecturas en el espectrofotómetro.

Alcance y aplicación

El método es aplicable a la estimación de los pigmentos en aguas naturales, especialmente marinas y continentales. El límite de detección depende del volumen de muestra de agua filtrada. En todos los casos, los registros de absorbancia del extracto final deben ser mayor a 0.2.

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numeral 2.1.

3.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro VIS
Celdas de 1 ó 10 cm de paso óptico

Set de filtros con sus accesorios
Filtro Millipore RAWP 0.47µm, 47 mm o de fibra de vidrio
Balones aforados de 100 ml
Homegenizador
Centrífuga

3.3 Reactivos

Acetona 90%: En un frasco de vidrio ámbar de 250 ml mezclar 20 ml de acetona con 180 ml de agua desionizada.

Acido clorhídrico: En frasco de vidrio de 200 ml, mezclar 50 ml de ácido con 50 ml de agua desionizada.

3.4 Procedimiento

Preparación de la muestra

- Filtrar al vacío un volumen de agua acorde con la cantidad de pigmentos clorofílicos esperados y adicionar unas pocas gotas de suspensión de carbonato de magnesio
- Secar los filtros mediante la succión y con ayuda de una pinza depositarlos en tubos de centrífuga aforados de 5 ml
- Almacenar refrigerado a -20°C

Tratamiento de la muestra

- Agregar a cada tubo 3 ml de acetona 90% y extraer durante 2 minutos con ayuda de un tubo homogenizador
- Diluir el homogenizado con acetona 90% hasta completar 5 ml exactos. Dejar en reposo 24 horas en la oscuridad
- Centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 10 minutos

- Ajustar si es necesario el volumen a 5 ml con acetona 90%
- Con pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante a la celda espectrofotométrica de 10 mm
- Seleccionar la longitud de onda 665 nm, y registrar la absorbancia de cada una de las muestras
- Seleccionar la longitud de onda 750 nm y ajustar nuevamente el 0 de absorbancia con la celda de referencia conteniendo acetona 90%
- Registrar la absorbancia de cada una de las muestras
- Remover la celda de la muestra, con un gotero adicionar 2 gotas de la solución de ácido clorhídrico, tapar la boca de la celda con aluminio y mezclar el contenido invirtiéndola 5 veces
- Registrar nuevamente la absorbancia de las muestras, a 665 y 750 nm

3.5 Cálculos

La concentración de Clorofila *a* en µg/l se determina por medio de la expresión siguiente:

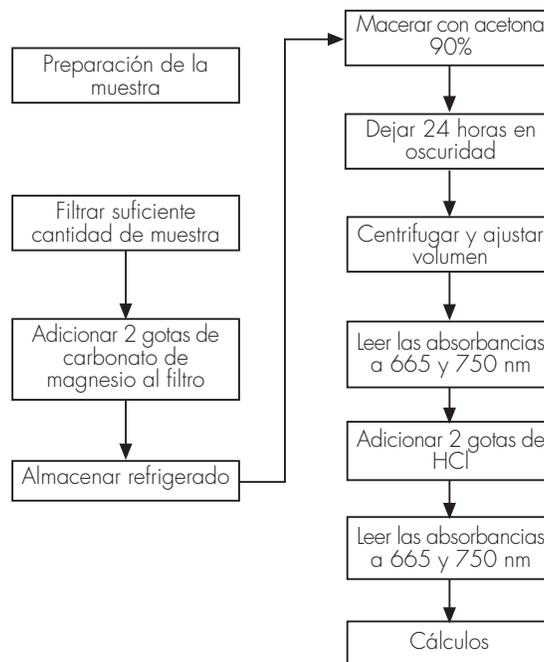
$$\text{Clorofila } a = \frac{27.63 (665_o - 665_a) (V_A)}{V_M \times L}$$

La concentración de feopigmentos en µg/l se determina por medio de la expresión siguiente:

$$\text{Feopigmentos} = \frac{26.7 [1.7 (665_a) - 665_o] (V_A)}{V_M \times L}$$

- 665_o = Absorbancia a 665 antes de acidificar
- 665_a = Absorbancia a 665 después de acidificar
- V_A = Volumen de acetona para la extracción (ml)
- V_M = Volumen de agua filtrada (l)
- L = Longitud de la celda fotométrica (cm)

3.6 Diagrama de flujo



3.7 Bibliografía de consulta

Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.

4. Determinación fluorométrica de clorofila "a" y feopigmentos

Este método permite la detección de la cantidad de fitoplancton en el agua de mar como una medida de la concentración de clorofila *a* y feopigmento *a*. Así mismo, puede llegar a cuantificarse la cantidad de biomasa total de una macroalga utilizando un factor o la cantidad de fitoplancton ingerido por invertebrados planctónicos marinos (*i.e.* copépodos).

El extracto de clorofila *a* en acetona al 90 % es medido en un fluorómetro, el cual, mediante una longitud de onda corta de excitación, eleva los niveles de energía de las moléculas de clorofila *a*; estas a su vez, al regresar a su nivel inicial de energía, liberan calor y fluorescencia que es cuantificada por el equipo a una longitud de onda larga de emisión.

El método puede tener como interferencias la presencia de compuestos fluorescentes que se exciten a la misma longitud de onda de la clorofila *a*, como es el caso de astaxantinas presentes en el cuerpo de los copépodos. También, la presencia de una relación clorofila *b:a* mayor a 0.2 podría causar una disminución aparente de la clorofila *a*.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a la estimación de los pigmentos en aguas naturales, especialmente marinas y continentales. El límite de detección depende del volumen de agua filtrado y la sensibilidad del fluorómetro.

En términos generales, el método es de 5 a 10 veces más sensible que el espectrofotométrico, pero podría ser menos exacto. Pueden llegar a obtenerse precisiones de hasta el 10% en réplicas de una misma muestra. Dada su alta sensibilidad, pueden llegar a ser obtenidos valores de hasta 0.1 ng clorofila *a* /l.

4.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Filtrar entre 500 ml y 10 l de agua de mar, o en su defecto al menos 10 copépodos a través de un filtro de fibra de vidrio tipo GF/F, cuyo tamaño de poro es entre 0.5 - 0.8 mm, por lo cual, permite una determinación de un amplio espectro del fitoplancton incluyendo desde el picofitoplancton hasta el microfitoplancton.

Para el caso de invertebrados planctónicos, es necesario capturar los individuos a partir de muestras narcotizadas en campo con solución de bicarbonato de sodio (*i.e.* soda) en proporción 1:10 v/v y congeladas a - 20 °C. La preservación de los individuos debe hacerse en frío y con la menor cantidad de luz para evitar la degradación de los pigmentos fotosintéticos.

Los filtros deben estar previamente lavados en gotas de MgCO_3 para prevenir una acidificación de la muestra. Posteriormente, pueden ser doblados y depositados en un desecador a -20°C y dejados en oscuridad hasta por 30 días, si los análisis no se van a realizar inmediatamente.

4.2 Materiales y equipos

Fluorómetro tipo Shimadzu RF-5301 PC con lámpara de Xenón de amplio espectro de longitud de onda

Equipo de filtración para filtros de 47 mm de diámetro

Centrífuga para tubos de ensayo entre 10 y 15 ml de capacidad

Homogenizador de tejidos motorizado

4.3 Reactivos

Acetona al 90%: Pipetear 100 ml de agua destilada y depositar en una botella volumétrica de 1 l que contenga 1000 ml de acetona de grado analítico. Se recomienda guardar el reactivo en un lugar fresco y en oscuridad.

Carbonato de magnesio: Adicionar 1.0 g de MgCO_3 a 100 ml de agua destilada. Homogenizar durante 20 min y depositar en goteros de vidrio de 100 ml. Antes de usar debe ser agitado fuertemente.

Acido clorhídrico: Diluir 10 ml de ácido clorhídrico fumeante al 37% de grado analítico en 100 ml de agua destilada. Depositarlo en una botella ámbar de 1 l y guardar en un lugar fresco y oscuro.

Clorofila pura: Homogenizar 1.0 mg de clorofila pura en grado analítico en 1 l de agua de mar, la cual ha sido filtrada a través de un filtro GF/F de 47 mm de diámetro y pasada por luz ultravioleta.

Extraer una muestra de la solución y preparar un extracto en acetona al 90% como se explica en el método espectrofotométrico (ver numeral 2.4)

4.4 Procedimiento

Lecturas de muestras

- Filtrar las muestras siguiendo el procedimiento descrito en el manejo de muestras y preservación, numeral 4.1
- Introducir el filtro en un tubo de ensayo plástico de polipropileno con tapa y adicionar 5 ml de acetona al 90% y dejar a 0°C y en oscuridad durante 12 a 18 horas
- Homogenizar el filtro durante 30 segundos a 1 min, con un homogenizador motorizado. Hacer el procedimiento en frío y oscuridad para evitar la evaporación potencial de la acetona por efecto de la rotación del aparato. Finalizada la homogenización, lavar el pistilo del homogenizador y las paredes internas del tubo de ensayo con 5 ml de acetona
- Centrifugar las muestras entre 20 y 30 minutos, dependiendo del modelo de la centrífuga
- Extraer el sobrenadante y pasarlo a una celda cuadrada de cuarzo no fluorescente de 1 cm de paso
- Ajustar el equipo a las λ_{ex} y λ_{em} descritas posteriormente y la mejor amplitud de rendija encontrado
- Leer la fluorescencia de la muestra antes y después de ser acidificada. Realizar la acidificación adicionando 2 gotas HCl diluido; esperar 30 segundos y volver a leer la fluorescencia emitida

4.5 Calibración

El equipo requiere ser calibrado en los siguientes parámetros, antes de iniciar las lecturas de muestras:

Factor de amplitud de la rendija (F_d):

- Extraer cerca de 50 ml de un monocultivo de microalgas en fase exponencial de crecimiento
- Estimar la concentración de clorofila *a* (Ca) mediante el método espectrofotométrico, expresada en $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y medir la fluorescencia de la misma muestra en una celda cuadrada de cuarzo no fluorescente de 1 cm de paso, para un ancho de rendija de 1 nm (F_1)
- Ajustar la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) en 436 nm y la longitud de onda de emisión (λ_{em}) en 660 nm. El factor de amplitud se calcula a partir de la fórmula:

$$F_d = Ca / F_1$$

F_1 = Ancho de rendija en nm

F_d = Factor de amplitud

- Repetir el mismo procedimiento para anchos de rendija de 2, 3, 4 y 5 nm. Posteriormente, diluir la muestra de microalgas en un factor de 2 y 10 y volver a repetir el procedimiento

- Usar el F_d más apropiado, establecido como aquel que presenta una mejor sensibilidad en la estimación de la concentración de la clorofila *a* y consistencia para cada una de las diluciones

Razón $R_{\text{sin ac.}}/R_{\text{acid.}}$: Corresponde al cociente entre la fluorescencia de una muestra de clorofila pura antes de acidificar ($R_{\text{sin ac.}}$) y después de ser acidificada con solución de HCl ($R_{\text{acid.}}$).

- Usar el extracto de acetona con clorofila pura y cuantificar la fluorescencia emitida usando las λ_{ex} y λ_{em} descritas anteriormente y la mejor amplitud de rendija encontrada
- Acidificar la muestra con 2 gotas HCl diluido. Esperar 30 s y volver a leer la fluorescencia emitida

Nota: Dependiendo del equipo de fluorimetría a utilizar, la calibración de este puede tener modificaciones. En caso de usar un fluorómetro tipo Turner Model III, puede remitirse al proceso de calibración propuesto por Parsons *et al* (1984).

4.6 Cálculos

La cantidad de clorofila *a* y feopigmento *a* se calcula a partir de la ecuación:

$$\text{mg clorofila } a - l^{-1} = F_d \times \frac{(R_{\text{sin ac.}} / R_{\text{acid.}})}{\{(R_{\text{sin ac.}} / R_{\text{acid.}}) - 1\}} \times (F_{\text{msinac.}} - F_{\text{mac.}}) \times \frac{v}{V}$$

$$\text{mg feopigmento } a - l^{-1} = F_d \times \frac{(R_{\text{sin ac.}} / R_{\text{acid.}})}{\{(R_{\text{sin ac.}} / R_{\text{acid.}}) - 1\}} \times \{(R_{\text{sin ac.}} \times F_{\text{mac.}} / R_{\text{acid.}}) - F_{\text{msinac.}}\} \times \frac{v}{V}$$

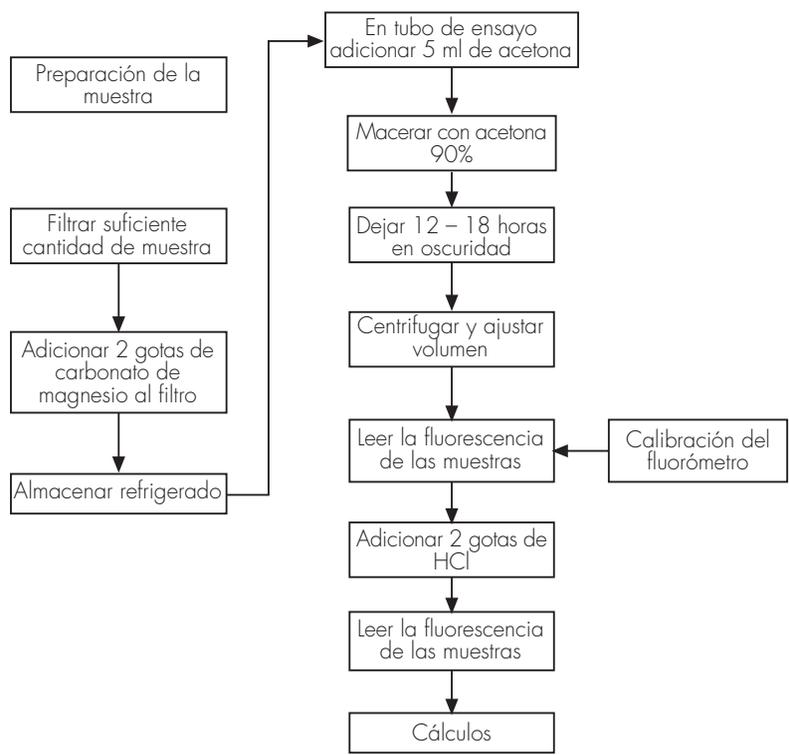
$F_{\text{msinac.}}$ = Fluorescencia de la muestra sin acidificar

$F_{\text{mac.}}$ = Fluorescencia de la muestra acidificada

v = Volumen de acetona utilizada en la extracción en ml

V = Volumen de agua de mar filtrada en l o en su defecto el número de invertebrados planctónicos usados en la extracción

4.7 Diagrama de flujo



4.8 Bibliografía de consulta

Parsons, T.R., Maita, Y. and C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 173 pp.

Salamanca, M. 1996. Laboratorio de Química Marina. Curso de Química Marina y Guía de Trabajos Prácticos. Departamento de Oceanografía. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción. Concepción. 68 pp.

CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA

La materia orgánica es toda clase de sustancia que involucra dentro de su estructura molecular el carbono, en el estudio ambiental hace referencia a dos tipos: a) la de origen viviente, que comprende de todos los residuos y desechos provenientes de organismos vivos, incluso los mismos organismos; y b) la de origen antrópico, en la que entran todas las sustancias sintetizadas por el hombre a través de procesos industriales.

La determinación del contenido orgánico del agua puede ser por:

- Ensayos específicos para medir las concentraciones de compuestos específicos; y
- Ensayos no específicos para medir la concentración total del contenido orgánico

Entre los ensayos para la concentración total están:

- Demanda biológica de oxígeno (DBO, ensayo bioquímico que utiliza microorganismos)
- Demanda química de oxígeno (DQO, ensayo químico)
- Carbono orgánico total (COT, ensayo instrumental)

De estos análisis el que requiere menos tiempo y sofisticación es el ensayo de la DQO. El ensayo del COT mide todo el carbono total como CO_2 en mg/l y por lo tanto, el carbono inorgánico (HCO_3^- , CO_2 y CO_3^{2-} , etc.) debe eliminarse antes del mismo. El método usado para eliminar el carbono inorgánico es la acidificación y la aireación. Este ensayo puede realizarse mediante la oxidación del carbono orgánico a CO_2 , a temperaturas de 950°C (calcinación), en presencia de un catalizador y luego determinarse el dióxido de carbono por espectrofotometría mediante absorción infrarroja (Kiely, 1999).

En algunos estudios investigativos el análisis de materia orgánica determinado por vía química es importante, por ejemplo, pensando en la realización de un modelo matemático, ya que permite correlacionar con un método químico los resultados de la DBO (que es otro indicador del contenido de materia orgánica en el agua), pero que se constituye en un parámetro biológico. Por eso en este documento se hace mención a otro análisis (oxidación con KMnO_4 en medio básico), que ha tenido menos divulgación, pero que ataca las interferencias causadas por las sales del agua de mar y se convierte en un método muy práctico para la determinación del contenido de materia orgánica por vía química en aguas salobres.

1. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_n)

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de un afluyente doméstico o industrial, es la cantidad de oxígeno disuelto que puede ser consumido por oxidación bioquímica de materia orgánica degradable, bajo condiciones específicas.

La DBO es solamente un índice general, cualitativo o semicuantitativo de los compuestos orgánicos susceptibles de ser degradados en un corto período de tiempo. El valor de la DBO, es con frecuencia incorrectamente usado como equivalente a la carga orgánica del agua o aguas de desecho, sin considerar la presencia de compuestos orgánicos no degradables.

Dependiendo del agua a investigar, el método incluye o no, la dilución de ciertas porciones de muestra con agua saturada de oxígeno e inoculación de un cultivo de microorganismos. El oxígeno disuelto se analiza en muestras por separado, al principio y al final del tiempo de incubación, normalmente 5 ó 7 días (DBO₅ o DBO₇) a 20°C. El contenido de oxígeno disuelto se mide por titulación, utilizando el Método de Winkler o por uso de electrodos de membrana sensibles al oxígeno.

Las pruebas de DBO se aplican para calcular el efecto que producen los efluentes domésticos o industriales, sobre el contenido de oxígeno en los cuerpos de agua receptoras y para evaluar su capacidad para asimilar descargas. En consecuencia, los datos de DBO son usados para criterio de ingeniería en proyectos de desarrollo y en control de plantas de tratamiento de aguas residuales. Las determinaciones de DBO solamente deben hacerse cuando en el agua a investigar están ausentes sustancias tóxicas.



Equipo para la determinación de la DBO por el Método Manométrico

Se han desarrollado varias técnicas para la determinación de la DBO, en vista de su gran aplicación y la necesidad de métodos menos dispendiosos (cuando se trata de muestras que requieren dilución); en proyectos de ingeniería, control de plantas depuradoras, caracterización de cuerpos de agua y calibración de modelos matemáticos; Muchas de estas técnicas se basan en métodos respirométricos; existen respirómetros manométricos, volumétricos y electrolíticos, también se ha avanzado gracias al desarrollo de los sensores de membrana para la determinación del oxígeno disuelto.

Alcance y aplicación

La determinación de la DBO por Winkler, sin dilución, es aplicable para aguas naturales, especialmente marinas y de ríos con bajo niveles de materia orgánica. En muestras salobres (25 psu) se puede determinar DBO hasta de 6 mg/l, después de saturar la muestra (la concentración de saturación de oxígeno de una muestra de agua a 25 psu y 20 °C a nivel del mar es de 7.83 mg/l).

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La colección de las muestras se hace en botella de vidrio, de un litro de capacidad, con boca y tapa esmeriladas. En el sitio de muestreo, se llenan las botellas con el agua en estudio, hasta que rebosen y se cierran sin dejar burbujas.

Las muestras estériles, de efluentes con alta demanda de oxígeno y otras propiedades (tales como un alto o bajo pH) que inhiban los procesos bioquímicos, pueden ser almacenadas de 1 a 4 días después del muestreo, preferiblemente a 4°C. Las muestras no estériles (procedentes de factorías de producción de papel, procesamiento de alimentos y descargas domésticas), deben ser analizadas tan pronto como sea posible después del muestreo. El retardo por transporte u otra causa no puede exceder el día y deberán conservarse a una temperatura de 4°C.

1.2 Materiales y equipos

Incubadora capaz de mantener una temperatura de 20 +/- 1°C

Bureta automática

Agitador magnético

Botellas DBO (preferiblemente de color ámbar)

Balones aforados de 1 l

Pipetas de 20, 10, 5, 2 y 1 ml

Pipetas automáticas de 2 ml

Vasos de precipitado

Erlenmeyers

Varilla de vidrio

1.3 Reactivos

Adicional a los reactivos utilizados para la determinación del oxígeno disuelto por el Método

Winkler (ver numeral 1.3 del capítulo Oxígeno disuelto y clorofilas), es necesario:

Solución de yoduro de potasio: Disolver 10.0 g de KI, en agua desionizada y diluir a 100 ml.

Solución de sulfito de sodio, 0.0125M: Disolver 1.6 g de Na₂SO₃ en agua desionizada y diluir en un litro. Preparar cada día.

Acido acético, 8.7 M: Adicionar 250 ml de ácido acético en 250 ml de agua desionizada.

1.4 Procedimiento

Las aguas de DBO reducidas (aguas superficiales como ríos, lagos, etc.) pueden trabajarse sin dilución si son enriquecidas con oxígeno. Si la muestra contiene materia suspendida, se debe decidir si se incluye o no en la prueba. Si se le incluye, deberá homogenizarse la muestra en un mezclador o en caso contrario removerla por sedimentación. El cloro activo se fija por adición de una cantidad equivalente de sulfito de sodio.

Para muestras con cloro libre

- Tomar 100 ml de muestra y añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio, 10 ml de ácido acético y una gota de indicador de almidón. Si aparece un color azul, titule con sulfito de sodio 0.0125 M justo hasta que el color azul desaparezca (anote el volumen del sulfito de sodio gastado como a ml).
- Tome otros 100 ml de muestra y añadir 10 ml solución de sulfito. Después de 10 minutos, agregar 10 ml de yoduro de potasio, 10 ml de ácido acético y unas gotas de indicador de almidón. Si la solución se vuelve azul, titular con más solución de sulfito de sodio hasta que el color desaparezca (anotar este volumen como

b ml). Finalmente, adicionar a la muestra (a + b) ml de solución de sulfito por cada 100 ml. Este volumen debe tenerse en cuenta para el cálculo del factor de dilución.

Procedimiento general

- Saturar la muestra con oxígeno utilizando una bomba durante unos 10 a 15 minutos elevando su contenido de oxígeno a 8 - 10 mg/l a 20 °C. Si el agua contiene sustancias que consumen oxígeno, incluso sin la colaboración de microorganismos, dejar en reposo durante dos horas antes de realizar la determinación.
- Llenar hasta el borde tres botellas DBO con muestra tratada aplicando un sistema de sifón para evitar la introducción de burbujas de aire. Cerrar inmediatamente dos de las botellas y colocarlas en un incubador a una temperatura constante de 20 +/- 1°C durante 5 días.
- Determinar inmediatamente el contenido de oxígeno disuelto de la botella restante según el Método Winkler y registrar el valor como C_0
- Después de 5 días +/- 6 horas, determinar el contenido de oxígeno disuelto de las botellas incubadas y registrar su promedio como C_5

1.5 Calibración

Realizar la estandarización del tiosulfato de sodio 0.01 N en cada una de las determinaciones de la concentración de oxígeno, C_0 y C_5 , de acuerdo con el numeral 1.5 del capítulo Otros Constituyentes.

1.6 Cálculos

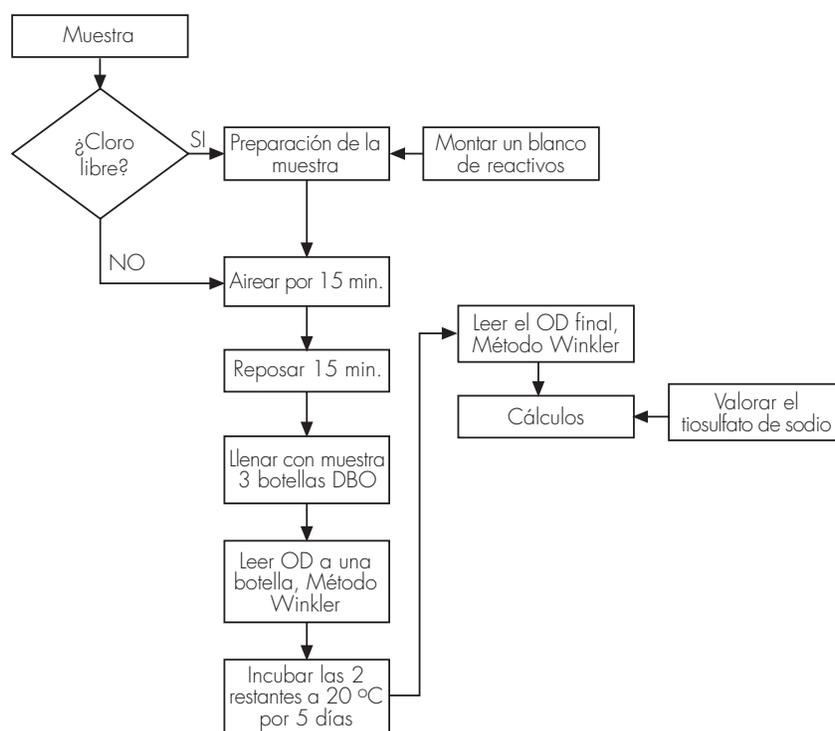
Para el cálculo de C_0 y C_5 aplicar la misma ecuación descrita para el cálculo de oxígeno disuelto (numeral 1.6 capítulo Otros Constituyentes). Calcular la DBO a partir de la ecuación:

$$DBO \text{ (mg O}_2\text{/l)} = d [(C_0 - C_n) - (B_0 - B_n)]$$

- d = Factor de dilución (razón de volumen de muestra diluida al de original)
- B_0 = Contenido de oxígeno disuelto del blanco de reactivos inicial
- B_n = Contenido de oxígeno disuelto del blanco de reactivo después de n días de incubación
- C_0 = Contenido de oxígeno disuelto en la muestra para el día cero
- C_n = Contenido de oxígeno disuelto en la muestra para el día n (n=5)

En el procedimiento sin dilución, cuando la muestra no es tratada, el factor de dilución es igual a 1.

1.7 Diagrama de flujo



1.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

2. Determinación de la materia orgánica en agua de mar por oxidación con permanganato en medio alcalino

La determinación de materia orgánica por vía química en el agua de mar se dificulta por su alto

contenido de cloruros, esto hace impráctico el uso de las técnicas tradicionales para tal fin como son la DQO por los métodos de reflujo abierto o micro.

El valor de la oxidación caracteriza el contenido de las sustancias que pueden oxidarse en el agua de mar. Debido a una gran diversidad y relativamente poco contenido de sustancias orgánicas en dichas aguas, su indicación y determinación es una tarea muy complicada; por esta razón, la determinación directa de estas sustancias se evalúa solamente para los casos de estudios especiales, como en el estudio de procesos y el desarrollo de modelos de ecosistema.

Para soluciones de problemas prácticos, se utiliza una metodología más simple e indirecta, la cual nos permite identificar la presencia de las sustancias orgánicas en el agua. Un método sencillo para las aguas de mar, es la determinación de la oxida-

ción por permanganato, según B. A. Skopinzev, bajo las condiciones del medio neutral. El principio del método se basa en la oxidación de reintegradores (recuperadores) orgánicos, los cuales están en las aguas, bajo condiciones especiales por oxidadores químicos activos. El valor de la oxidación se determina por la cantidad del oxidante gastado y se expresa por el número de miligramos de oxígeno, el cual es necesario para oxidar las sustancias en un litro de agua (mg O/l).

Uno de los oxidantes que sirve para la determinación de la oxidación del agua, es la solución de Permanganato de potasio (KMnO_4). La reacción de oxidación por permanganato puede ser en medio ácido, básico o neutro. La reacción total ocurre en medio ácido, pero si el agua analizada contiene muchos cloruros, este no puede ser aplicado, debido a que en estas condiciones los cloruros se oxidan acompañados de la liberación del cloro. Por esta razón, la oxidación de aguas con concentraciones de cloruros mayores de 0.3 g/Kg se realiza en medio neutro o básico.

Para determinar la oxidación, la muestra se trata con la solución de permanganato de potasio hirviéndola durante 10 minutos. Los restos del permanganato de potasio, después de la oxidación de la materia orgánica, se determinan por titulación inversa, eliminando el resto del permanganato con el yoduro de potasio; la cantidad de yodo libre que se libera y que equivale a KMnO_4 , se titula con la solución de tiosulfato. Así, la cantidad del permanganato (en equivalentes de oxígeno), que se ha gastado para la oxidación de materia orgánica en la muestra, se calcula por la diferencia de los volúmenes de la solución de tiosulfato (A), gastado en la titulación de todo el volumen de KMnO_4 y del tiosulfato (B) gastado en la titulación del KMnO_4 restante después de la oxidación de la materia orgánica.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, especialmente marinas y de ríos, con bajos niveles de materia orgánica.

La precisión del método aún está por establecerse.

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

La colección de las muestras se hace en botella de vidrio con boca y tapa esmeriladas preferiblemente, de 500 ml de capacidad. Las botellas con el agua en estudio se llenan en el sitio de muestreo, hasta que rebosen y se cierran sin dejar burbujas.

Es necesario realizar el análisis cuanto antes; sin embargo, si esto no es posible, las botellas se deben guardar congeladas a -20°C .

2.2 Materiales y equipos

Pipetas aforadas de 2, 5 y 10 ml
Balones fondo redondo de 500 ml
Matraces aforados de 1 l
Refrigerantes
Probetas de 100 ml
Balanza
Pipeta graduada de 5 ml
Titulador o bureta graduada
Digestor de seis puestos
Vitrina de extracción

2.3 Reactivos

Permanganato de potasio 0.01 N: Pesar 0.32 g de reactivo analítico y diluir en agua bidestilada; completar a un litro.

Solución de soda cáustica al 33% (NaOH): Diluir 50 g del álcali químicamente puro en 100 ml de agua bidestilada.

Ácido sulfúrico (1:3): Preparar apartir del ácido sulfúrico concentrado, adicionando 100 ml de ácido a 300 ml de agua bidestilada.

Solución de tiosulfato de sodio 0.01N: Para su conservación se prepara una solución de 1 N, de la cual se diluye lo necesario con agua destilada obteniéndose la concentración requerida (0.01 N) para los análisis. Para una mejor conservación de la solución, añadir 1 ml de cloroformo. Esta solución debe valorarse antes de ser utilizada.

Solución estándar de yodato de potasio 0.01 N (KIO₃): Pesar exactamente 0.3567 g de yodato de potasio, previamente secado; disolver en agua destilada y completar a 1 l en un matraz aforado.

Yoduro de potasio al 10% (KI): Disolver 25.0 g de KI y ajustar el volumen a 250 ml con agua bidestilada.

Solución de almidón 3%: Disolver por calentamiento 3.0 g de almidón soluble en 100.0 g de glicerina.

Agua de mar sintética: Disolver 25.0 g de NaCl y 4.0 g de MgSO₄ en agua bidestilada y llevar a 1000 ml.

2.4 Procedimiento

Determinación de la correlación de las soluciones de permanganato de potasio y tiosulfato

- En un beaker de 250 ml colocar 5 ml de la solución de yoduro de potasio, añadir 100 ml de agua destilada y 2 ml de ácido sulfúrico 1:3, agregar 10 ml de solución de permanganato de potasio 0.01 N

- Agitar bien y titular separando el yodo con la solución de tiosulfato 0.01N hasta obtener un color amarillo claro
- Añadir 2 gotas de solución de almidón y continuar la titulación de la solución azulada hasta decoloración total. La determinación se realiza dos veces y si la diferencia en las lecturas no supera los 0.05 ml, se toma la media aritmética (A)

Determinación de la oxidación en las muestras

- Después de determinar la correlación, se pasa a la determinación de las muestras
- En un balón redondo de 250 ml vertir 100 ml de la muestra
- Añadir 3 ml de soda cáustica y 10 ml de permanganato de potasio 0.01N y agregar 3 perlas de ebullición
- Colocar en el digestor con sus respectivos refrigerantes y calentar por espacio de 10 minutos, contados a partir de la ebullición. Al terminar de hervir las muestras dejar reposar unos treinta minutos hasta lograr la temperatura ambiente
- Añadir 3.6 ml de ácido sulfúrico 1:3, agitar y agregar 5 ml de solución de yoduro de potasio
- Adicionar 3 ml más de ácido sulfúrico 1:3
- Titular con la solución de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta que la muestra tome un color amarillo claro, agregar 2 gotas de almidón y seguir la titulación hasta decoloración total

2.5 Calibración

Diariamente, antes de la titulación es necesario comprobar la verdadera normalidad de la solución de tiosulfato como se muestra a continuación, ya que con el transcurso del tiempo esta cambia.

- Colocar 10 ml de la solución de yoduro de potasio al 10% y se diluirla en 50 ml de agua destilada
- Agregar 10.0 ml exactos de KIO_3 0.01 N y 2 ml de ácido sulfúrico y agitar
- Titular con la solución de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta obtener un color amarillo claro
- Añadir 2 gotas de solución de almidón y continuar la titulación de la solución azulada hasta decoloración total
- Para la valoración se realizan de 2 a 3 titulaciones paralelas y si la diferencia de las lecturas entre las buretas no supera los 0.05 ml, se toma la media aritmética como resultado final (V_2)

Determinar la verdadera normalidad del tiosulfato por:

$$N_t = \frac{10 \text{ ml} \times N_{KIO_3}}{V_2}$$

N_{KIO_3} = Normalidad del yodato de potasio (0.01N)

La diferencia más significativa de las determinaciones paralelas se presenta debido a que las soluciones de trabajo se mezclan mal o los reactivos utilizados no están lo suficientemente puros. En estos casos es necesario encontrar y eliminar las causas del error y realizar nuevamente los cálculos.

2.6 Cálculos

La oxidación de las muestras se calcula por la fórmula:

$$\text{Oxid.mg O/l} = \frac{8 * (A-B) * N_t * 1000}{V}$$

- A = Volumen de tiosulfato gastado en la correlación con el permanganato
- B = Volumen de tiosulfato gastado en la titulación de las muestras después de la digestión
- N_t = Normalidad del tiosulfato de sodio
- V = Volumen de la muestra (100 ml)

Recomendaciones

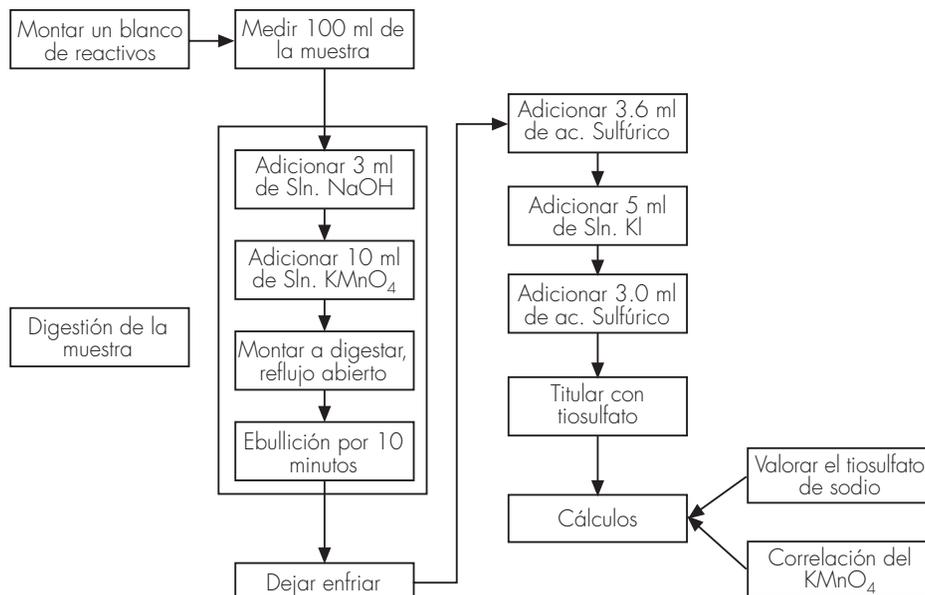
Durante el tiempo de cocción y enfriamiento las muestras deberán conservar un color azul-violeta (color exceso de permanganato). Si el color de las muestras cambia a pardo, se indica que el exceso de permanganato desapareció, mostrando el aumento del contenido de sustancias orgánicas, puesto que todo el contenido del permanganato añadido se consumió en la oxidación. En este caso se repite la muestra tomando menor cantidad (50, 25, 10 o 5 ml) y se diluye en agua bidestilada hasta 100 ml.

Junto con cada set de muestras debe montarse un blanco de reactivos, utilizando para ello agua de mar sintética; el valor obtenido en este blanco debe utilizarse para corregir el de las muestras.

Antes de iniciar el análisis toda la vidriería debe lavarse bien y ponerse a hervir 5 minutos con una solución fuerte de permanganato de potasio.

Después de la titulación se lavan bien los balones con agua destilada para continuar con las otras muestras. Una vez terminado el análisis, toda la cristalería se lava cuidadosamente y se pone a secar.

2.7 Diagrama de flujo



2.8 Bibliografía de consulta

Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.

3. Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es la medida del equivalente en oxígeno del contenido de materia orgánica de una muestra que es susceptible de oxidación por un oxidante químico fuerte. Para muestras de una fuente específica, la DQO puede relacionarse empíricamente con la DBO, carbono orgánico o contenido de materia orgánica. El método de reflujo con dicromato es el más aceptado para su determinación debido a su mayor capacidad oxidativa, aplicabilidad a una gran variedad de muestras y fácil manipulación.

La mayoría de materiales orgánicos son oxidables por una mezcla en ebullición de ácidos crómico y sulfúrico. Una muestra es colocada en reflujo en una solución fuertemente ácida con un exceso conocido de dicromato de potasio, después de la digestión, el dicromato que no se ha reducido es titulado con sulfato ferroso amoniacal (FAS). La cantidad de dicromato consumido y la cantidad de materia orgánica oxidable se determina en términos de equivalentes oxígeno.

Los compuestos alifáticos de cadena larga no muy oxidable, se oxidan más fácilmente en presencia de un catalizador como el sulfato de plata. Sin embargo, esto sólo funciona con haluros que al ser oxidados parcialmente son precipitados; esto puede causar dificultades en el análisis, las cuales pueden ser subsanadas aplicando sulfato de mercurio antes del proceso de reflujo. La prueba no debe aplicarse en muestras que contengan más de 2000 mg de cloruros/l.

Los nitritos, eventualmente causan interferencias que pueden eliminarse adicionando 10 ml de ácido sulfámico por cada mg NO_2^- presente en el balón de reflujo. Adicionar la misma cantidad de ácido sulfámico al blanco de agua destilada.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a aguas residuales industriales y domésticas; puede ser usado en aguas marinas siempre y cuando el contenido de cloruros no supere los 2000 mg Cl/l en la muestra.

Un conjunto de muestras sintéticas de ftalato ácido de potasio y NaCl fueron probadas en 74 laboratorios. Para una DQO de 200 mg O_2 /l en ausencia de cloruros, la desviación estándar fue +/-13 mg/l (coeficiente de variación de 6.5%). Para una DQO de 160 mg O_2 /l y 100 mg Cl/l, la desviación estándar fue de +/- 14 mg/l (coeficiente de variación 10.8%). (APHA, 1998).

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las muestras deben recolectarse en botellas de vidrio preferiblemente ámbar. Si el análisis no se puede realizar de inmediato, es necesario disminuir el pH de la muestra por debajo de 2 unidades para evitar el crecimiento bacteriano, generalmente 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por litro son suficientes para lograrlo. La muestra debe guardarse refrigerada y protegida de la luz por un periodo no superior a 7 días.

3.2 Materiales y equipos

Digestor de seis puestos
Vitrina de extracción
Balón de 250 ml de boca esmerilada

Condensador
Placa de calentamiento
Pipetas graduadas de 5 ml
Titulador o bureta graduada

3.3 Reactivos

Solución estándar de dicromato de potasio 0.250 N ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$): Disolver 12.258 g de dicromato grado estándar primario, previamente secado a 103 °C por dos horas en agua destilada y diluya a 1000 ml.

Sulfato de plata grado técnico o reactivo en cristales o polvo.

Acido sulfúrico concentrado.

Solución indicadora ferroina: Disolver 1.485 g de 1,10 - monohidrato de fenantrolina y 695 mg de sulfato de hierro en agua destilada y diluir a 100 ml. Esta solución puede comprarse ya preparada.

Sulfato ferroso amoniacal (FAS) 0.25 N [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$]: Disolver 24.5 g de sulfato ferroso amoniacal en agua destilada. Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico, enfriar y diluir a 250 ml.

Sulfato de mercurio en cristales o polvo.

Acido sulfámico: Requerido sólo si se necesita eliminar la interferencia por nitritos.

Estándar de ftalato ácido de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$): Triturar suavemente y luego secar el reactivo a peso constante a 120 °C. Disolver 425.5 mg en agua destilada y diluir a 1000 ml, esta solución tiene una DQO teórica de 500 +/- 15 mg. O_2 /l (1.0 mg de ftalato ácido tiene una demanda total de oxígeno de 1.176 mg).

3.4 Procedimiento

3.4.1 Muestras con DQO mayor 50 mg/l

- Colocar 50 ml de muestra (para muestras con DQO mayor a 900 mg DQO/l, usar una porción más pequeña y diluir a 50 ml) en un balón de 500 ml
- Adicionar un gramo de sulfato de plata (Ag_2SO_4), varios cuerpos de ebullición y muy lentamente agregar 5.0 ml de ácido sulfúrico agitando para disolver el sulfato de plata, enfriar mientras se mezcla para evitar pérdidas de componentes volátiles
- Adicionar 25 ml de solución de dicromato 0.250 N y mezclar. Unir el balón al condensador y poner a circular el agua refrigerante. Adicionar el resto de ácido sulfúrico (60 ml) por el extremo abierto del condensador. Continuar agitando mientras se adiciona el ácido
- Precaución: Agitar la mezcla de reflujo antes de aplicar calor para evitar calentamiento local del fondo del balón y una posible explosión de sus contenidos
- Usar 1.0 g de sulfato de mercurio (con una muestra de 50.0 ml) para complejar un máximo de 100 mg de cloruros; para muestras más pequeñas usar menos sulfato de mercurio. De acuerdo con la cantidad de cloruros, mantener una relación 10:1 de $\text{HgSO}_4:\text{Cl}^-$. Un ligero precipitado no afecta negativamente la determinación. Generalmente, *en muestras con más de 2 g/l de cloruros* no es posible la medida exacta
- Mantener el reflujo por dos horas. Cubrir la abertura del condensador con un beaker para evitar el ingreso de sustancias extrañas. Enfriar y lavar el condensador con agua destilada
- Desconectar el condensador de reflujo y diluir la muestra a casi el doble de su volumen con agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y titular los excesos de dicromato con FAS, usan-

do 0.10 - 0.15 ml (2 a 3 gotas) de indicador ferroina. Aunque la cantidad de ferroina no es crítica, usar la misma para todas las titulaciones. Tomar como el punto final de la titulación el primer cambio pronunciado de color desde azul verdoso a pardo rojizo. El azul verdoso puede reaparecer

- Someter a reflujo y titular de la misma manera el blanco de agua destilada que contiene los mismos volúmenes de reactivo aplicado a las muestras

3.4.2 Muestras con baja DQO

- Se sigue el mismo proceso descrito anteriormente, pero usando solución estándar de dicromato 0.025 N y titulado con FAS 0.025 N. Es necesario tener especial cuidado con este proceso debido a que aún una traza de materia orgánica en la vidriería o de la atmósfera puede causar gran error
- Si se requiere mayor sensibilidad, concentrar un mayor volumen de muestra antes de digerir en el reflujo, adicionando todos los reactivos a una muestra mayor que 50 ml y reduciendo a 50 ml por ebullición en el balón de reflujo abierto a la atmósfera sin condensador adherido
- Computar la cantidad de sulfato de mercurio adicionado (antes de la concentración) con base en una razón de 10:1 $\text{HgSO}_4:\text{Cl}^-$, usando la cantidad de cloruro presente en el volumen original de muestra
- Llevar a cabo un blanco aplicando el mismo procedimiento

Esta técnica tiene la ventaja de concentrar la muestra sin pérdidas significativas de materiales volátiles fácilmente digeribles. Materiales de difícil digestión como ácidos volátiles se pierden, pero se obtiene una ventaja sobre los métodos corrientes de concentración evaporativa.

3.5 Calibración

La solución de sulfato ferroso amoniacal (FAS) debe estandarizarse diariamente contra la solución de dicromato, así:

- Diluir 10.0 ml de solución estándar de dicromato hasta aproximadamente 100 ml
- Adicionar 30 ml de ácido sulfúrico concentrado y enfriar
- Titular con FAS, usando 0.10 a 0.15 ml (2 a 3 gotas) de indicador ferroina

$$N = \frac{V_D}{V_{FAS}} \times 0.25$$

N = Normalidad de la solución FAS
 V_D = Volumen de solución de dicromato 0.25 N titulado (ml)

V_{FAS} = Volumen de solución FAS utilizado en la titulación (ml)

Con el conjunto de muestras también debe montarse una solución estándar de ftalato ácido de potasio, teniendo en cuenta que 1.0 mg de ftalato ácido tiene una demanda total de oxígeno de 1.176 mg.

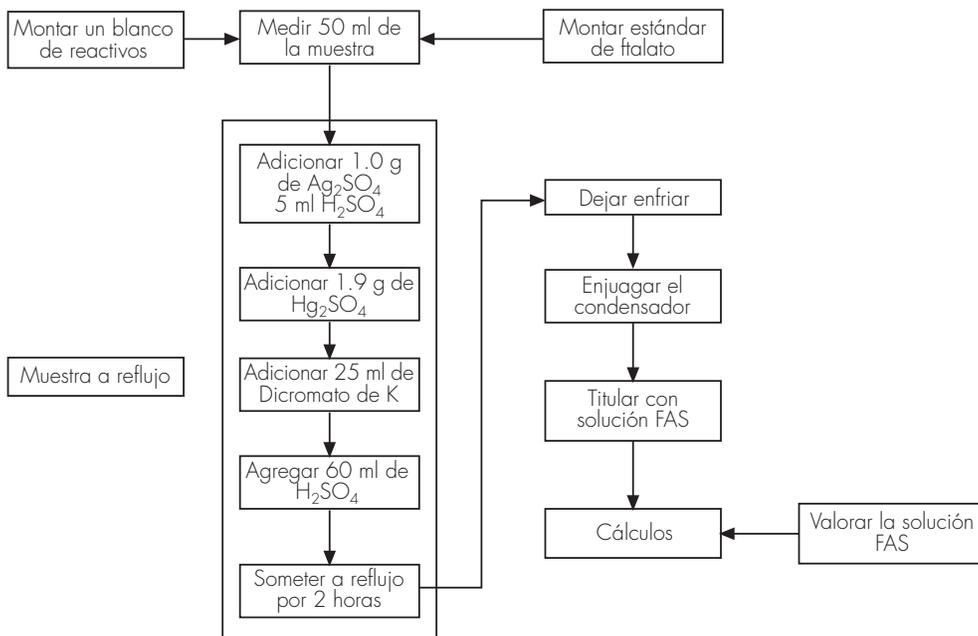
3.6 Cálculos

La demanda química de oxígeno se determina como:

$$\text{mg DQO/l} = \frac{(A - B) \times N \times 8000}{\text{ml muestra}}$$

A = Volumen de FAS usado para el blanco (ml)
 B = Volumen de FAS usado para la muestra (ml)
 N = Normalidad del FAS

3.7 Diagrama de flujo



3.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 5-14 pp.

4. Materia orgánica en suelos y sedimentos, método de oxidación con dicromato (BS 1377:1975)

Existen tres procedimientos para la determinación del contenido orgánico en suelos, estos son:

- Pérdida por ignición
- Oxidación con peróxido de hidrógeno
- Oxidación con dicromato

El Método del Dicromato es uno de los recomendados en la BS1377:1975, como el procedimiento estándar para suelos. Fue introducido primeramente por Walkley en 1935. Se ha encontrado que da resultados reproducibles y aunque la exactitud no es absoluta, es suficiente para propósitos de ingeniería. En suelos que contienen sulfuros o cloruros da resultados altos. Si estas sustancias están presentes, deben ser removidas de la muestra en la etapa de preparación mediante un tratamiento químico adecuado, como se describe en el procedimiento.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de sedimento de origen marino o continental. La exactitud no es absoluta pero es suficiente para propósitos de ingeniería.

4.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

En muestras de sedimento la recolección se hace con draga o corazonador, se transfiere con cuchara

de hierro inoxidable o plástica a un contenedor hecho de papel aluminio. Si el análisis no se realiza inmediatamente, es preciso congelar la muestra a una temperatura de -20°C .

4.2 Materiales y equipos

Balanza con una precisión de $\pm 0.001\text{g}$
Horno de secado ($105-110^{\circ}\text{C}$)
Dos frascos volumétricos de 1 l
Dos buretas, graduadas a 0.1 ml
Pipetas de 1 y 10 ml
Dos erlenmeyers de 500 ml
Una probeta de 200 ml y 20 ml
Un pesasales
Tamices, de 10 mm y $425\ \mu\text{m}$ de tamaño de malla
Mortero y mango
Desecador

4.3 Reactivos

Solución de dicromato de potasio 1N: Disolver 49.035 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua destilada y completar a un litro de solución.

Solución de ácido sulfúrico 0.5N: Adicionar 14 ml de H_2SO_4 concentrado en agua destilada y completar a un litro de solución.

Ácido sulfúrico concentrado (Gravedad específica 1.84).

Solución de sulfato ferroso de aproximadamente 0.5N: Disolver 140.0 g de sulfato ferroso en ácido sulfúrico 0.5N y completar a un litro de solución. Esta solución es inestable al aire; por lo cual, debe mantenerse herméticamente tapada. Semanalmente debe ser estandarizada con solución de dicromato de potasio.

Ácido fosfórico al 85% (Gravedad específica 1.70-1.75).

Solución indicadora: Disolver 0.25 g de difenilamina sulfonato de sodio en 100 ml de agua destilada. En su defecto puede utilizarse solución indicadora de ferroina (ver numeral 3.3).

4.4 Procedimiento

Preparación de la muestra

Sólo se requiere una pequeña muestra para el análisis, pero se debe homogeneizar correctamente para que sea representativa.

- La muestra es secada en un horno a 105 – 110°C, enfriada en un desecador y pesada con una exactitud de 0.1% (m_1)
- Pasar a través de un tamiz de 10 mm
- Pesar la masa que pasó con una exactitud de 0.1% (m_2). Tener cuidado de no perder cualquier partícula fina
- Reducir la muestra por divisiones sucesivas hasta aproximadamente 100 g

Muestras que contienen sulfuros

Los sulfuros pueden interferir en los resultados, dando valores altos. Para eliminarlos, adicionar ácido sulfúrico diluido (2N) hasta que no ocurra ninguna emanación de sulfuro de hidrógeno, luego lavar con agua. Secar en un horno antes de proceder a la próxima etapa.

Suelos que contengan cloruros

los cloruros también pueden producir resultados altos. Para removerlos, lavar el suelo con agua destilada, hasta que ninguna turbidez sea observada cuando una gota del agua de lavado es

probada con solución de nitrato de plata. Secar en un horno antes de proceder con la siguiente etapa.

- Pulverizar la muestra con mango y mortero, de tal forma que pase a través de un tamiz de 425 micras
- Subdividir la muestra hasta que pese 5.0 g aproximadamente. Mezclar completamente
- Colocar la muestra en un recipiente de pesaje y secar en un horno a 105-110°C
- Enfriar en un desecador y pesar con una precisión de +/-0.001g (m_3)
- Transferir una pequeña cantidad para el análisis a un erlenmeyer limpio de 500 ml, sin pérdida alguna de material

La cantidad a ser transferida estará en el rango de aproximadamente 5.0 g para suelos de bajo contenido de materia orgánica, hasta 0.2 g para suelos muy ricos.

Determinación de la materia orgánica:

- Pesar la muestra a tratar (1.0 g) y colocarla en un recipiente cónico (erlenmeyer de 500 ml es suficiente)
- Vertir 10 ml de dicromato de potasio a la muestra
- Adicionar con una probeta, cuidadosamente, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado
- Mezclar y agitar por 1 minuto, dejar reposar por 30 minutos sobre una base de asbesto o madera mientras se enfría y ocurre el proceso de oxidación de la materia orgánica. Proteger el recipiente de rupturas
- Adicionar 200 ml de agua destilada
- Adicionar 10 ml de ácido fosfórico, 1 ml de indicador y agitar completamente. Si el indicador es absorbido por el sedimento adicionar 1 ml más de indicador y agitar

- Realizar la titulación del exceso de dicromato, adicionando sulfato ferroso con incrementos de 0.5 ml y agitar el recipiente, hasta que se produzca un cambio de coloración de azul a verde (con difenilamina sulfonato de sodio como indicador)

4.5 Calibración

Junto con las muestras llevar a cabo un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento que en la muestra, utilizando 1.0 ml de agua destilada.

Es necesario realizar la estandarización del sulfato ferroso cada vez que se vaya a emplear, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Medir 10 ml de solución 1N de dicromato de potasio y transferirlo hacia un erlenmeyer
- Adicionar cuidadosamente 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agitar la mezcla y dejar enfriar, colocar en una superficie aislante
- Adicionar 200 ml de agua destilada
- Adicionar 10 ml de ácido fosfórico y 1 ml de indicador, y mezclar completamente
- Adicionar sulfato ferroso desde una bureta con incrementos de 0.5 ml, agitar el frasco hasta que se produzca un cambio de color de azul a

verde, registrar el volumen de solución de sulfato ferroso utilizado

4.6 Cálculos

Calcular el volumen, en ml (V), de dicromato de potasio usado, para oxidar la materia orgánica en el sedimento a partir de la siguiente ecuación:

$$V = 10 (1 - Y/X)$$

Y = Volumen de sulfato ferroso usado en la titulación de la muestra

X = Volumen usado en la estandarización

Expresado como porcentaje el cálculo de materia orgánica presente con base a peso seco de muestra es:

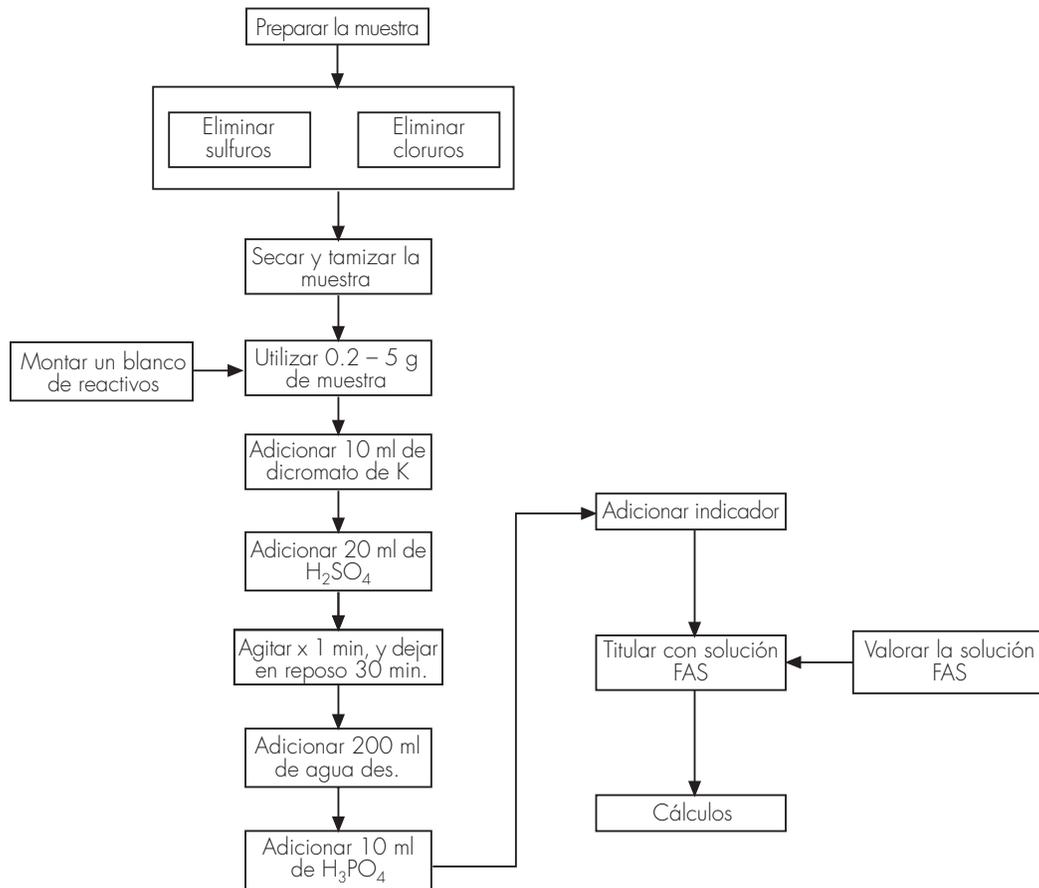
$$\text{Porcentaje de M.O.(\%)} = 0.67 \times m_2 \times \frac{V}{m_1 \times m_3}$$

m_1 = Peso de muestra antes de tamizar

m_2 = Peso de muestra que pasa a través del tamiz de 10 mm

m_3 = Peso de sedimento usado en el análisis

4.7 Diagrama de flujo



4.8 Bibliografía de consulta

FAO. 1984. Métodos Físicos y Químicos de Análisis de Suelos y Aguas. Boletín de suelos de la FAO.

COMPUESTOS TÓXICOS QUÍMICOS

1. Hidrocarburos disueltos y dispersos en aguas (CARIPOL, 1980)

El petróleo está constituido principalmente por hidrocarburos que se pueden dividir en dos grandes grupos: alifáticos y aromáticos; entre estos, los aromáticos resultan ser los más tóxicos dado su efecto cancerígeno.

Los métodos que permiten determinar la concentración de hidrocarburos en aguas, sedimentos y organismos, se fundamentan en la utilización de instrumental especializado para ello. Tal es el caso de la cromatografía de gases y la espectrofluorimetría. Como la fluorescencia se presenta sólo en los hidrocarburos aromáticos, esta técnica es aplicable para la determinación de hidrocarburos disueltos y dispersos en aguas.

En la fluorescencia, el material es irradiado con una longitud de onda dada, el extracto o la materia absorbe esta energía y luego, después de un tiempo, la irradia en otra longitud de onda, la cual es analizada por medio de un sistema óptico y un fotodetector.

La cromatografía de gases es una técnica en la cual se usa una fase móvil (un gas de arrastre) y una estacionaria o adsorbente para separar los compuestos individuales; en ella, una pequeña

fracción del orden de microlitros de muestra es inyectada a la columna con una microjeringa y los hidrocarburos son vaporizados y movidos a través de la columna por el gas de arrastre. Ellos viajan a diferentes ratas dependiendo de la diferencia entre los coeficientes de partición de las fases móvil y estacionaria. Cada componente es observado como un pico en la carta de registro.

El tiempo de retención es característico del hidrocarburo en particular y el área /altura del pico es proporcional a su cantidad. El detector usado en estos análisis es un Detector de Ionización de Llama (FID) que es muy sensible a los hidrocarburos. Debido a que el FID también responde a varios compuestos, estas sustancias deben ser removidas por un proceso de separación y limpieza con silica-gel y/o alúmina. Ambas tienen la capacidad de absorber los materiales polares. Si una solución de hidrocarburos y materiales grasos es mezclada con estas, los ácidos grasos son selectivamente removidos de la solución; el material no eliminado por absorción se considera como hidrocarburos (APHA, 1998).

El fluorómetro determina la concentración de hidrocarburos disueltos y dispersos en el agua mediante la medición de un extracto de ellos. Los hidrocarburos aromáticos tienen la propiedad de fluorecer. La intensidad de fluorescencia se mide

en una celda de sílice o cuarzo de 1 cm de paso óptico usando una longitud de onda de excitación de 310 nm y una de emisión de 360 nm.

Se usan estándares de criseno disuelto en hexano. La eficiencia fluorescente de los petróleos varía y es por lo general, mucho menor para el petróleo que para el criseno. Sin embargo, es importante tener resultados comparativos con estándares de petróleo, más que con los de criseno.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable para aguas de desperdicio de refinerías, efluentes de sentinas en los buques, y aguas aledañas a los terminales de carga y descarga de oleoductos. También se aplica para aguas de intenso tráfico fluvial o marítimo.

El alcance de este método se limita al agua comprendida entre la superficie y una profundidad de 1 m. A profundidades mayores, la concentración de los hidrocarburos disueltos o dispersos se hace muy pequeña, siendo difícil de detectar por medio de esta técnica.



Spectrofluorómetro Shimadzu 5301-PC utilizado para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Totales (HAT)

1.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Para la toma de las muestras se recomienda el uso de un dispositivo, el cual consta de un soporte metálico en el que se sujeta una botella de vidrio ámbar de 2.5 l. La botella debe tener una boca pequeña (+/-3 cm) de tal modo que se llene lentamente.

Antes de su uso, la botella debe ser lavada con detergente y tratada con sulfocrómica, enjuagada con agua de llave, agua destilada y preextraída con hexano, seguida de metanol, acetona y finalmente hexano. Una vez limpia, entre la tapa y la botella se coloca un pedazo de papel aluminio lavado con hexano y después tratado térmicamente (300°C). El dispositivo con la botella se ata a un flotador de 1 metro de distancia, se destapa, se lanza al agua y una vez llena se recoge con un segundo cordel de recuperación. Esta primera muestra, utilizada como enjuague, se desecha y se lanza nuevamente la botella. De la segunda recogida, se desechan 10 ml de agua para permitir la expansión. Se tapa del mismo modo que después de lavada y se rotula para posterior extracción. La extracción se debe hacer en el menor tiempo posible y el extracto debe mantenerse en la oscuridad.

1.2 Materiales y equipos

Cromatógrafo de gases con columna capilar de sílice fundido de 30 m de longitud x 0.25 mm diámetro interno revestido de una fase líquida (HP-5 o similar)

Spectrofotómetro de fluorescencia con registrador de datos

Centrífuga

Hojas de aluminio

Frasco de vidrio de 5 ml para los extractos

Erlenmeyer de 150 ml
Balanza analítica (+/- 0.0001 g)
Rotavapor
Balones aforados de 10, 25 y 50 ml
Embudo de decantación de 250 ml con válvula y tapa de teflón
Pipeta Pasteur
Microjeringa de 5 – 10 µl

1.3 Reactivos

Metanol
Hidróxido de potasio
Hexano
Acetona
Acido sulfúrico concentrado
Oxido de aluminio (alúmina)
Lana de vidrio
Dicromato de potasio
Diclorometano para análisis de residuos
Estándares de hidrocarburos aromáticos y alifáticos certificados

Alúmina desactivada 5%: Se activa calentando a 300 °C durante 8 horas y se desactiva con agua destilada al 5% de su peso.

Sílica gel desactivada 5%: Se activa con un proceso similar al anterior pero el calentamiento es sólo a 120 °C.

Estándar de criseno: Pesar 10 mg de criseno (pureza mayor al 98%) en balanza analítica, disolver con n-hexano, completar a 50 ml. Esta solución tiene una concentración de 200 µg/ml. Se debe mantener refrigerada y protegida de la luz (realizar la corrección de concentración con la pureza).

1.4 Procedimiento

Extracción - procedimiento del método de la pipeta

- Medir el volumen exacto de la muestra con una probeta y hacer la extracción con hexano
- Usar 100 ml de hexano en dos extracciones sucesivas y combinar los extractos
- Separar aproximadamente 80 ml de la muestra en un erlenmeyer limpio
- Agregar 50 ml de hexano a la muestra en la botella se tapa la botella, junto con el papel aluminio, y agitar vigorosamente
- Después de unos segundos, aflojar la tapa para que salgan los vapores de hexano y se repite el proceso por 5 minutos
- Colocar la botella boca arriba para separa la fase de hexano. Esta fase debe llegar hasta el cuello de la botella, si no es así se lleva a ese nivel agregando la muestra que se había separado
- Con una pipeta previamente enjuagada con hexano, extraer la fase hexánica y transferir a un erlenmeyer el cual debe tener tapa de vidrio
- El proceso se repite con otros 50 ml de hexano y se rotula el erlenmeyer
- Agregar un poco de sulfato de sodio anhidro al extracto para remover el exceso de agua, se tapa y almacena para el análisis

Concentración

Los extractos hexánicos se someten a concentración en un equipo rotavapor hasta un volumen de 0.5 ml. Se trasladan a viales y se guardan hasta el siguiente paso.

Purificación

- En una columna rellena de silicagel, pasar el extracto para eliminar sustancias fluorescentes que intervienen en la medición fluorométrica
- La elución por la columna se realiza con hexano
- El extracto final se concentra en rotavapor hasta 2 ml aproximadamente y se deposita con pipeta Pasteur en viales pequeños, para su posterior cuantificación

Cuantificación

La cuantificación fluorométrica del extracto permite sólo la determinación de los hidrocarburos aromáticos totales:

- Tomar los viales de las fracciones aromáticas de las muestras y el blanco que deben estar a sequedad
- Reconstituir los extractos a 2.5 ml o más, si es necesario
- Hacer la lectura en el fluorómetro usando como blanco de lectura n-Hexano

Si se desea la cuantificación de la fracción alifática se debe emplear la técnica de cromatografía de gases, para ello el extracto debe ser sometido a un proceso de limpieza y fraccionamiento con alúmina, más adelante, en el numeral 2.4.1 (Procedimiento para la determinación de hidrocarburos en sedimentos), se amplía este proceso. Luego se procede a la cuantificación de la fracción alifática (F1) y de la aromática (F2 y F3) para esto:

- Se reconstituye el extracto en 50 µl de hexano y se inyectan 1-2 µl al cromatógrafo previa calibración de las condiciones del equipo

1.5 Calibración

Fluorometría

El instrumental se calibra de acuerdo con las instrucciones del fabricante para lograr la sensibilidad deseada, seleccionando longitud de onda de excitación de 310 nm y de emisión de 360 nm y los slit de banda.

- Tomar una muestra de hexano para determinar el blanco de reactivos
- Realizar una curva de calibración usando criseno como estándar. La preparación de los estándares se realiza de la siguiente manera:

Preparar un stock secundario: tomar 1250 µl del estándar de criseno y llevar a 25 ml con hexano, la concentración de esta nueva solución es de 10 µg/ml.

Tomar 100, 300, 500, 700 y 900 µl del stock secundario y completar a 10 ml, con hexano; las concentraciones de estas soluciones son 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 µg/ml respectivamente.

Leer la fluorescencia a cada solución y aplicar una regresión lineal a los resultados y determinar la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración ($Y = mX + b$).

$$\text{Flu} = C * m + b$$

Y = Flu = Unidades de fluorescencia de la muestra

X = C = Concentración del extracto (ug/ml)

b = Intercepto

Cromatografía

El cromatógrafo debe ser calibrado para obtener su máxima sensibilidad, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En general se busca adecuar los flujos de hidrógeno y aire para la mayor sensibilidad.

Si se requiere la cuantificación individual de cada hidrocarburo (por lo general los alcanos normales del C10 al C34, y algunos aromáticos de interés como los pirenos, naftalenos, antracenos), se deben elaborar curvas de calibración para cada uno, para lo cual es necesario:

- Inyectar soluciones de cada compuesto para determinar sus tiempos de retención
- Preparar una solución que contenga todos los compuestos de interés; esta solución será el stock primario y contendrá una concentración “relativamente alta” de cada compuesto
- A partir del stock primario, preparar soluciones de menor concentración (que estén dentro del rango lineal de respuesta del detector), se preparan tantas soluciones como puntos de calibración vayan a tener las curvas

Inyectar cada solución en el cromatógrafo y con los reportes del equipo elaborar las curvas de calibración para cada compuesto. Aplicar una regresión lineal para los resultados y determinar la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración para el compuesto i ($Y = mX + b$).

$$\text{Área} = C_i * m + b$$

$Y = \text{Área} = \text{Área del pico reportado por el cromatograma}$

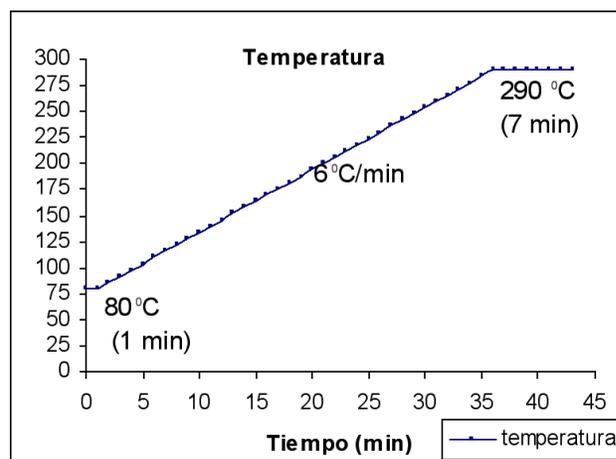
$X = C_i = \text{Concentración del compuesto } i \text{ en la solución (ng/ul)}$

$b = \text{Intercepto}$

Para la determinación del Mezcla Compleja no Resuelta (UCM) de hidrocarburos petrolígenos se toma la línea de base del patrón de alcanos. El área se calcula con un planímetro para dicha cuantificación se utiliza como patrón el área del pico de uno de los estándares.

El INVEMAR cuenta con un Cromatógrafo Perkin – Elmer modelo Sigma 300 con detector FID, el cual opera bajo las siguientes condiciones para el análisis de hidrocarburos alifáticos.

Columna empacada 3% OV –101 3 ft	
Flujo del gas arrastre (N_2):	20 ml/min
Presión del hidrógeno	18 psi
Presión del aire	36 psi
Temperatura del inyector:	220 °C
Temperatura del detector:	310 °C
Temperatura del horno:	
Inicial	80°C (1 min)
Final	290 °C (7 min)
Rata:	6°C/min



1.6 Cálculos

Fluorimetría

El cálculo de concentración en la muestra se efectúan así:

Con la curva de calibración según el numeral 1.5 se obtiene la concentración del extracto en $\mu\text{g/ml}$.

$$C = \frac{\text{Flu} - b}{m}$$

C = Concentración del extracto en $\mu\text{g/ml}$
 Flu = Fluorescencia del extracto
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

La concentración en la muestra sería:

$$\text{ng/l} = \frac{M \times V_e \times 1000}{V}$$

M = Concentración del extracto de muestra ($\mu\text{g/ml}$)
 Ve = Volumen final del extracto (ml)
 V = Volumen de muestra sometida a análisis (l)

Cromatografía

Identificados los picos del cromatograma, con las áreas reportadas se procede a calcular la concentración en el extracto, así:

$$C_i = \frac{\text{Área}_i - b}{m}$$

Y = Área_i = Área del pico reportado por el cromatograma
 X = C_i = Concentración de la sustancia *i* en el extracto ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

La concentración de la sustancia *i* en la muestra sería:

$$\text{ng/l} = \frac{C_i \times V_e}{V}$$

C_i = Concentración de la sustancia *i* en el extracto de muestra
 Ve = Volumen final del extracto (μl)
 V = Volumen de muestra sometida a análisis (l)

La concentración de los hidrocarburos no resueltos (UCM) se calcula utilizando un factor de respuesta de un compuesto alifático del cromatograma del stock de estándares. Este pico debe estar bien definido y localizado en el centro del cromatograma.

Para obtener la concentración por litro de muestra se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{UCM} = \frac{P(\text{UCM}) \times V_e}{V}$$

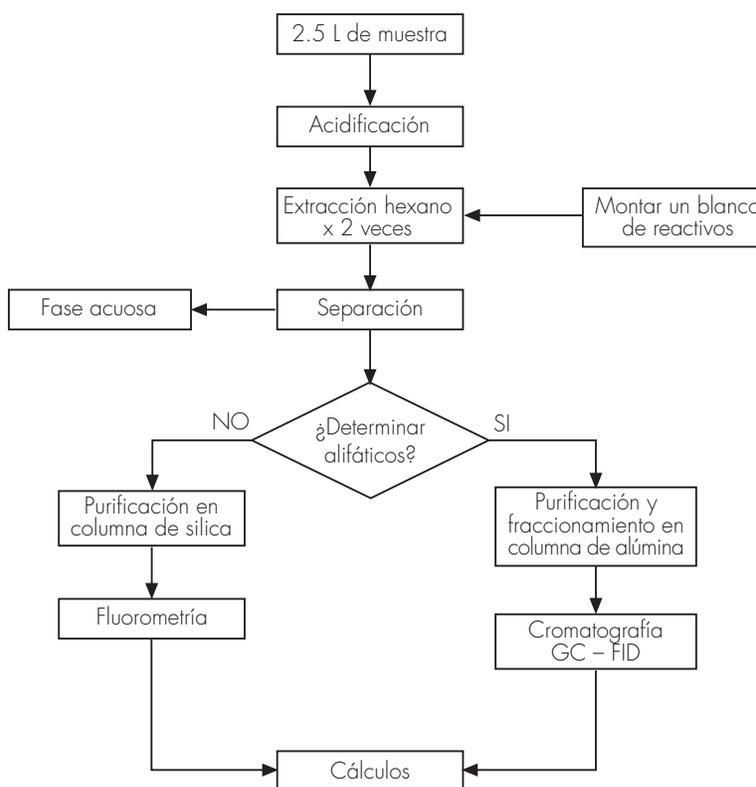
UCM = Concentración de UCM (ng/l)
 P(UCM) = Concentración en el extracto ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 Ve = Volumen final del extracto (μl), o disolución en el vial ($50 \mu\text{l}$)
 V = Volumen de muestra (l)

Recomendaciones

- El material de vidrio utilizado tanto en la toma de muestras como en los análisis, debe lavarse con mezcla sulfocrómica, agua corriente, agua destilada y preextraída, metanol y finalmente, se lava con hexano

- Recordar montar un blanco de reactivos por cada conjunto de muestra
- Durante el análisis fluorométrico cerciorarse de que no tenga lugar en la celda de cuarzo el efecto Quenchee el cual produce grandes errores

1.7 Diagrama de flujo



1.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 6-79 pp.

CARIPOL. 1980. Manual para la vigilancia de la contaminación por petróleo. IOCARIBE/CARIPOL, pp 12-22.

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de In-

vestigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

2. Determinación de hidrocarburos en sedimentos y organismos marinos (UNESCO/IOCARIBE, 1986)

El presente método es utilizado para la determinación de hidrocarburos adsorbidos en sedimentos marinos y estuarinos.

Las muestras pueden abarcar tanto el subsuelo marino, como las playas. Si se requiere un estudio más detallado, se debe separar las muestras en dos fracciones, mayor y menor a $63\ \mu\text{m}$.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de sedimento de origen marino, continental o estuarino y a todo tipo de organismo, en especial a los marinos filtradores.

La precisión del método está muy relacionada con la técnica final (fluorometría o cromatografía), empleada para la cuantificación de los hidrocarburos.

2.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Con una draga metálica tipo Van Veen y con ayuda de espátulas de acero inoxidable o plásticas enjuagadas con hexano, se recogen las muestras de sedimentos en bolsas plásticas de sello hermético, aunque es más aconsejable el uso de recipientes de vidrio tapados con papel aluminio, y se congelan hasta el momento del análisis.

Si la muestra es húmeda deberá ser congelada, pero si es seca, se puede almacenar indefinidamente. Durante el secado no se deben sobrepasar los 60°C , para evitar la pérdida de los componentes más volátiles. Es mejor secar las muestras por liofilización o someter al proceso la muestra húmeda y tomar una submuestra para el cálculo de la humedad; si es necesario, se deben eliminar todos los organismos presentes a través de una maya de 250 mm antes de analizar la muestra.

Debe tenerse especial cuidado en la manipulación de las muestras en el interior de la embarcación porque suele haber gasolina y aceite lubricante

que pueden contaminarlas. También es importante abstenerse de usar productos bloqueadores o bronceadores para la piel pues suelen contener hidrocarburos y sustancias que fluorescen.

Por lo general, ostras y peces deben transportarse congelados y protegidos en bolsas plásticas hasta el laboratorio, en donde el sedimento adherido a las valvas se remueve con cepillo y agua. Una vez limpios los organismos, se abren y con la ayuda de cuchillos de acero inoxidable se extraen las partes que se someterán a análisis: músculo, vísceras, tejido graso, etc. Si el análisis no es realizado de inmediato, deben guardarse congeladas (-10 a $-20\ ^\circ\text{C}$), preferiblemente en frascos de vidrio, tapados con papel aluminio.

2.2 Materiales y equipos

Ver numeral 1.2.

2.3 Reactivos

Adicional a los reactivos del numeral 1.3. se requiere:

Solución de KOH metanólico: Disolver 30.0 g de hidróxido de potasio en 1000 ml de metanol. Almacenar refrigerado. Esta solución tiende a sellar los tapones esmerilados, por lo cual es aconsejable utilizar frascos con tapones de plástico.

Solución de hidróxido de potasio 6N: Disolver 120 g de KOH en 500 ml de agua destilada. Almacenar en un frasco con tapa plástica.

2.4 Procedimiento

2.4.1 Sedimentos

Digestión

- En un matraz limpio y seco, de fondo redondo, pesar aproximadamente 30.0 g del sedimento húmedo
- Adicionar 100 ml de KOH/MeOH al 3%, 20 ml de agua destilada y cuerpos sólidos de ebullición previamente lavados con n-hexano
- Someter el sedimento a una saponificación mediante reflujo durante 1 hora y media
- De cada set de muestras, una de ellas se debe trabajar por duplicado, y se dopará con 100 µl de un estándar interno n-C₂₂ 100 µg/ml, lo cual permitirá determinar el porcentaje de recuperación

Extracción

- Enfriar el extracto metanólico a temperatura ambiente, decantar y transferir el sobrenadante a un matraz
- Lavar dos veces con 30 ml de MeOH, juntando los lavados metanólicos sobrenadantes en el mismo erlenmeyer; éstos son previamente centrifugados a 3000 rpm durante cinco minutos en tubos de 47 ml con tapa rosca y teflón.
- Transferir los extractos metanólicos a un embudo de decantación y extraer dos veces con 25 ml de hexano

Concentración

- Rotavaporar la fase hexánica reduciendo el volumen a 0.5 ml. Desechar la fase metanólica
- Transferir cuantitativamente a un vial limpio y seco el extracto hexánico que contiene los hidrocarburos y lípidos no saponificables

Purificación y fraccionamiento

- Preparar una pipeta Pasteur con lecho de lana de vidrio lavada con hexano y rellenar con Alúmina (120 - 230 mesh), hasta cinco centímetros de altura

- Lavar tres veces la columna con 2 ml de hexano y sembrar el extracto de la muestra en la columna
- Proceder a realizar el fraccionamiento utilizando los siguientes eluyentes:

Eluyente	Fracción	Volumen	Sustancias separadas
Hexano	F1	4 ml	Hid. alifáticos
Hexano		4 ml	Solvente
Hexano: diclorometano 7:3	F2	4 ml	Aromáticos mono y dinucleares
Diclorometano	F3	4 ml	Aromáticos polinucleares

- Los extractos de cada fracción se dejan secar para su posterior cuantificación.

Cuantificación

- La fracción F1 se analiza por cromatografía gaseosa para la determinación de hidrocarburos alifáticos
- Si el objetivo es determinar hidrocarburos aromáticos totales (HAT), las fracciones F2 y F3 se pueden combinar y la resultante se analiza por espectrofluorometría.
- Si se desea realizar una cuantificación de aromáticos individuales es mejor trabajar e inyectar cada extracto por separado en el cromatógrafo. Ver numerales 1.4 y 1.5 para más detalles

2.4.2 Organismos

Digestión

- Pesar 10 g de muestra en un erlenmeyer y agregar 25 ml de solución de hidróxido de potasio 6N
- Inyectar a una de las muestras que se trata por duplicado 100 µl de estándar interno n-C₂₀

(eicosano) con concentración de 260 ug/ml y dejar a 30°C durante 18 horas aproximadamente

Extracción

Luego de completada la digestión del organismo se procede a la extracción de los hidrocarburos petrogénicos:

- Agregar 15 ml de éter etílico, agitar y centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos
- Separar la capa sobrenadante absorbiéndola con una pipeta Pasteur. Transferir este extracto a un matraz y repetir el proceso tres veces

Concentración

- Secar el extracto final dentro del balón, aproximadamente 45 ml en rotavapor hasta concentrarlo a unos 0.5 ml

Purificación y cromatografía

Armado la columna para la purificación del extracto de la siguiente manera:

- Agregar 8 g de sílica seguidos por 8 g de alúmina
- Lavar la columna mediante unos 20 ml de hexano. La columna debe compactarse bien y no contener burbujas de aire; esto se consigue golpeandola levemente con un objeto flexible mientras se va agregando la alúmina y sílica, respectivamente
- Una vez lavada la columna, agregar el extracto de 0.5 ml contenido en el balón. Para obtener la primera fracción (alifáticos) añadir 20 ml de hexano. Esta se recoge en un matraz
- La segunda fracción se obtiene agregando 20 ml de 10% de diclorometano en hexano y la tercera fracción con 40 ml al 20% diclorometano en hexano, de acuerdo con el siguiente cuadro:

Eluyente	Fracción	Volumen	Sustancias separadas
Hexano	F1	20 ml	Hid. alifáticos
10% diclorometano en hexano	F2	20 ml	Aromáticos mono y dinucleares
20% diclorometano en hexano	F3	40 ml	Aromáticos polinucleares

Todas las fracciones recogidas en matraces son rotaevaporadas hasta 0.5 ml para luego ser transferidas a sus respectivos viales. El extracto del vial deberá tener unos 4 ml.

Cuantificación

- Una vez recogidos, se pueden evaporar a sequedad con nitrógeno gaseoso, para su posterior análisis instrumental
- Para la determinación de hidrocarburos alifáticos, la fracción F1 se analiza por cromatografía de gases
- Las fracciones F2 y F3 se pueden analizar por espectrofluorimetría. Ver numerales 1.4 y 1.5 para más detalles

2.5 Calibración

Para la calibración de los dos métodos (fluorométrico o cromatográfico), seguir el procedimiento descrito en el numeral 1.5.

2.6 Cálculos

Fluorometría

El cálculo de concentración en la muestra se efectúa así:

La curva de calibración según el numeral 1.5 da la concentración del extracto en $\mu\text{g/ml}$.

$$C = \frac{\text{Flu} - b}{m}$$

- C = Concentración del extracto ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
 Flu = Fluorescencia del extracto
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

La concentración en la muestra (sedimento u organismos), sería:

$$\mu\text{g}/\text{g} = \frac{M \times V_e}{W}$$

- M = Concentración del extracto de muestra ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
 Ve = Volumen final del extracto (ml)
 W = Peso de muestra seca sometida a análisis (g)



Cromatógrafo de gases Perkin – Elmer Sigma 300 con detector FID, utilizado para la identificación y cuantificación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos

Cromatografía

Identificados los picos del cromatograma, con las áreas reportadas se procede a calcular la concentración en el extracto, así:

$$C_i = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

- Y = Área = Área del pico reportado por el cromatograma
 X = Ci = Concentración de la sustancia i en el extracto ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 b = Intercepto
 m = Pendiente de la curva de regresión

La concentración de la sustancia i en la muestra sería:

$$\mu\text{g}/\text{g} = \frac{C_i \times V_e \times 0.001}{W}$$

- Ci = Concentración de la sustancia i en el extracto de muestra ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 Ve = Volumen final del extracto (μl)
 W = Peso de muestra seca sometida a análisis (g)

La concentración de los hidrocarburos no resueltos (UCM) se calcula utilizando un factor de respuesta de un compuesto alifático del cromatograma del stock de estándares. Este pico debe ser bien resuelto y estar localizado en el centro del cromatograma.

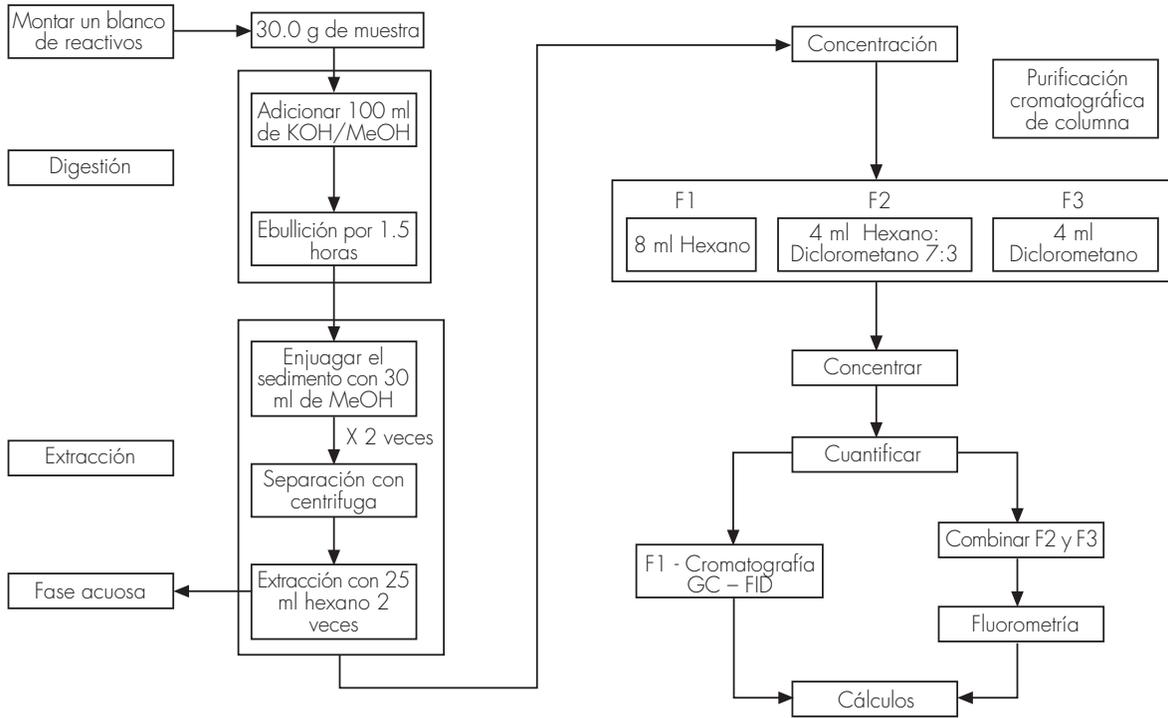
Para obtener la concentración por gramo de muestra se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{UCM} = \frac{P(\text{UCM}) \times V_e \times 0.001}{W}$$

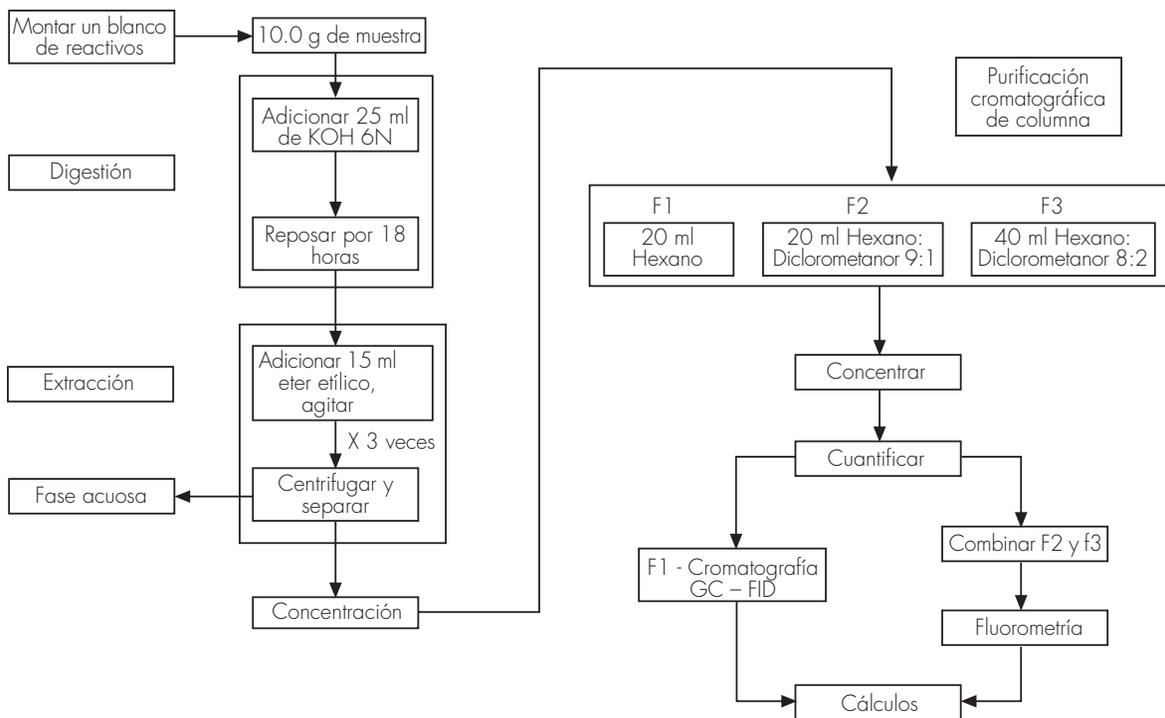
- UCM = Concentración de UCM ($\mu\text{g}/\text{g}$)
 P(UCM) = Concentración en el extracto ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 Ve = Volumen final del extracto (μl), o disolución en el vial (50 μl)
 W = Peso de muestra seca (sedimento u organismo, g)

2.7 Diagrama de flujo

HIDROCARBUROS EN SEDIMENTOS



HIDROCARBUROS EN ORGANISMOS



2.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

3. Determinación de plaguicidas organoclorados en aguas (método EPA, 1980)

La aplicación a gran escala de pesticidas en áreas agrícolas contribuye a la presencia de estas sustancias tóxicas en la superficie terrestre y finalmente en suplementos de agua. El transporte de las mismas desde sus fuentes hasta cuerpos de agua, puede efectuarse por drenaje de terrenos aledaños, precipitación atmosférica, derrames accidentales en un área o por un sistema de distribución.

Para su determinación se aplica la cromatografía de gases. En este proceso estas sustancias son extraídas con una mezcla de solvente, dietileter/hexano o metilencloruro/hexano. El extracto es concentrado por evaporación y si es necesario, limpiado por columna de absorción. Posteriormente, puede realizarse el análisis cromatográfico propiamente dicho.

El sistema de detección para la determinación cromatográfica de este tipo de sustancias es un detector de captura de electrones (ECD). Sin embargo, algunas sustancias diferentes a éstas producen señales o causan envenenamiento del mismo, por lo cual, se recomienda su eliminación de la muestra antes de analizar. Para tal fin, se aplican técnicas de limpieza como el uso de columnas de silicato de magnesio (Florisil) y procesos

de separación. Usualmente las aguas potables no requieren el tratamiento de limpieza.

Algunos pesticidas son sustancias muy inestables, por tal razón la validez de los resultados analíticos depende del muestreo y del manejo de la muestra. El método aquí descrito se fundamenta en extracción sucesiva de la muestra con mezclas de éter-hexano. El extracto obtenido se concentra y se pasa por una columna empacada con florisil para ser fraccionado mediante la elución con éter-hexano en diferentes proporciones. Los extractos son luego concentrados y analizados por cromatografía de gases usando detector ECD.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de aguas naturales, efluentes industriales y domésticos.

El rango óptimo de trabajo es 10^{-9} - 10^{-12} g, dado por la linealidad del detector. La mínima concentración que puede ser detectada es de 10^{-12} g y los siguientes compuestos pueden determinarse por este método: Clordano, α -BHC, β -BHC, Lindano, Heptacloro, Epoxido, p,p'-DDE, o,p'-DDE, Dieldrin, Endrin, p,p'-DDD, o,p'-DDD, p,p'-DDT, y o,p'-DDT.

3.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las botellas de muestreo, y todo el material de vidrio empleado en el análisis debe ser lavado con agua y detergente, enjuagado con metanol seguido por n-Hexano, luego secado en un horno a 250°C. Todo el material de vidrio debe ser almacenado en cabinas libres de polvo y cubierto con papel aluminio hasta su uso. Es necesario remover todo residuo orgánico del material manteniéndolo por lo menos dos horas en solución sulfocrómica.

Precaución: Se debe tener mucho cuidado para evitar contacto con la piel o inhalación del ácido sulfocrómico.

Las muestras de agua a diversas profundidades son colectadas en botellas Nansen o Niskin y almacenadas en botella de 1 litro de capacidad. En aguas "limpias" es preciso tomar una mayor cantidad (2.5 l). Cuando las muestras son superficiales pueden ser tomadas directamente en la botella de vidrio a unos 25 cm por debajo de la superficie, para evitar la adhesión de películas de aceite o materiales extraños.

Máximo dos horas después de haber sido tomadas deben ser llevadas al laboratorio y analizadas. Si el análisis no se realiza inmediatamente, las muestras deben ser refrigeradas entre 2 a 4° C, sin que pasen más de 15 días, si el análisis es de organoclorados o siete, si el estudio es para organofosforados. Es conveniente agregarles el solvente de extracción.



Cromatógrafo de gases Perkin – Elmer Auto System con detector ECD, utilizado para la identificación y cuantificación de compuestos organoclorados

3.2 Materiales y equipos

Cromatógrafo de gases equipado con Detector de Captura Electrónica (ECD)
Rotavaporador
Concentrador Kuderna Danish
Balanza con precisión +/- 0.00001 g
Horno para secado
Sistema de vacío
Beakers de 100, 150, 200 y 1000 ml
Probeta graduadas de 50, 100 y 250 ml
Erlenmeyers de 125 y 250 ml
Tubos de centrifuga de 50 ml
Columnas de vidrio de 25 cm de largo x 1 cm de diámetro interno con llave de Teflón
Embudos de separación de 2 l
Pipetas Pasteur
Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, y 10 ml
Matraz aforado de 25, 50 y 100 ml
Pinzas y espátulas de acero inoxidable
Microjeringas de 10 µl
Desecadores
Viales de 2 ml con tapa rosca de teflón

3.3 Reactivos

Gas nitrógeno (N₂) grado 4.5
n-Hexano calidad pesticida
n-Decano
Eter etílico
Acetona
Metanol calidad pesticida
Florisil P.R, 60 - 100 Mesh
Acido sulfúrico concentrado, libre de hidrocarburos clorados (HC)
Sulfato de sodio anhidro
Dicromato de potasio

Estándares puros de pesticidas (hidrocarburos clorados): alfa-hexaclorociclohexano (α-BHC), β-BHC, (γ-BHC o Lindano, Aldrín, p,p' -Diclorodifenil-

dicloroetano (DDD), p,p'-Diclorodifenil-dicloroetileno (DDE), p,p'-Diclorodifeniltricloroetano (DDT), Dieldrin, entre otros, todos de 100 ng/μl. Las soluciones de trabajo son preparadas por diluciones sucesivas con solvente.

Precaución: Los compuestos estándares son altamente tóxicos y deben ser manejados con extremo cuidado para evitar contacto con la piel o inhalación.

3.4 Procedimiento

Extracción

- Depositar la muestra en un embudo de separación de 2 l; la extracción también se puede realizar en la misma botella de la muestra
- Adicionar 75 ml de eter al 15% en hexano y agitar vigorosamente durante 2 minutos
- Dejar en reposo para separar las dos fases
- Transferir la fase orgánica a un erlenmeyer conteniendo 0.5 – 1.0 g de Na₂SO₄ anhidro; si la extracción se realiza en la misma botella, utilizar una pipeta de 25 ml para transferir la fase orgánica o extracto
- Tapar el erlenmeyer con papel aluminio
- Adicionar al embudo de separación 50 ml de eter al 6 % en hexano, agitar durante 2 min. y repetir el paso anterior reuniendo el extracto con el anterior en el mismo erlenmeyer
- Si se desea determinar PCBs en la muestra, adicionar a la misma en el embudo de separación 50 ml de hexano puro, agitar por 2 min y repetir el segundo paso depositándolo en un erlenmeyer aparte. Los PCBs intervienen severamente en la cromatografía de los plaguicidas organoclorados
- Agitar la mezcla de los dos extractos y concentrar en rotavapor al vacío hasta un volumen de 2 ml aproximadamente

Preparación de la columna de Florisil

- La cromatografía de columna se prepara empleando una columna de vidrio de 25 cm de alto y de 1.0 cm de diámetro interno
- Enjuagar con acetona las columnas para fraccionar y colocarlas en la estufa a 110°C
- Fijar una pieza de lana de vidrio en el extremo inferior para retener el adsorbente
- Mezclar 16 g de Florisil con 30 o 40 ml de n-hexano los cuales son vertidos a la columna
- Adicionar 1.0 cm de sulfato de sodio sobre el nivel de Florisil, para evitar disturbios en la primera capa cuando los solventes son vertidos a la columna
- Eluir 50 ml de n-hexano como lavado

Purificación en columna de Florisil

- Concentrar el extracto en Kuderna Danish o baño María hasta 0.5 ml
- Percolar el extracto en una columna de Florisil
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 6%
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 15%
- Reunir los dos eluidos anteriores en un erlenmeyer de 100 ml.
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 50%. Recibir en otro erlenmeyer
- Colocar alambre de cobre o mercurio metálico para la desulfuración, hasta que no se aprecie la precipitación de los sulfuros sobre el metal.
- Concentrar en rotavapor hasta 2 ml
- Almacenar el extracto en un vial de vidrio de 5 ml para su análisis final por cromatografía de gases

Purificación con ácido sulfúrico concentrado

- Concentrar el extracto en baño María hasta 0.5 ml
- Transvasar el extracto a un tubo de 10 ml con tapa rosca

- Adicionar 1 ml de H_2SO_4 concentrado, agitar vigorosamente por 30 segundos
- Dejar en reposo hasta la separación de las fases
- Enjuagar con 20 ml de n-hexano
- Retirar con una pipeta Pasteur la fase ácida. Repetir el proceso hasta que la fase orgánica sea clara y completamente traslúcida
- Lavar el extracto con agua desionizada, agitar y retirar la fase acuosa
- Adicionar suficiente cobre o mercurio metálico para desulfurar el extracto
- Adicionar 0.5 g de Na_2SO_4 anhidro para secar el extracto
- Almacenar el extracto en un vial de vidrio de 5 ml para su análisis final por cromatografía de gases
- Si el análisis cromatográfico no se realiza inmediatamente, mantener refrigerados los extractos a +/- 2 °C y protegidos de la luz

Cuantificación

La cuantificación de cada pesticida se realiza a través de un análisis por cromatografía de gases, los extractos secos de las muestras, se reconstituyen con 25 - 100 μ l de n-Decano (nC10), y se inyecta 0.5 μ l en el cromatógrafo de gases con detector ECD.

3.5 Calibración

Ajustar el cromatógrafo para obtener su máxima sensibilidad; ayuda mucho tener en cuenta las especificaciones del fabricante. Esto se consigue, adecuando los flujos de nitrógeno para una mayor sensibilidad, se deben establecer los flujos de make-up y de arrastre en la columna. Si el equipo posee un sistema split, también se debe definir el tiempo durante el cual permanece abierta la válvula y las razones de flujo de la purga y el split.

Diariamente, antes de iniciar el análisis de las muestras, se debe hacer el background del equipo y correr un cromatograma en blanco o línea base, únicamente solvente (n-C10), y otro con una mezcla de referencia de plaguicidas. Esto con el objeto de evaluar la señal del instrumento antes de cualquier medida y también conocer los tiempos de retención (t_R) de los compuestos de referencia de la mezcla a las condiciones de funcionamiento del equipo.

La identificación y cuantificación individual de cada hidrocarburo clorado requiere de la elaboración de curvas de calibración para cada compuesto. Es necesario la preparación de soluciones de cada uno de ellos a concentraciones que estén dentro del rango lineal del detector, estas soluciones de patrones individuales se inyectan para determinar los tiempos de retención de cada compuesto.

Stock primario: Preparar una solución que contenga todo los compuestos de interés. Esta solución será el stock primario y contendrá una concentración “relativamente alta” de cada compuesto. Una solución con 100 ng/ μ l de cada compuesto es suficiente (pesar 5.00 mg de cada organoclorado y llevar a 50 ml en balón aforado con hexano).

Comercialmente también se consiguen mezclas de varios pesticidas, con concentraciones certificadas; su empleo puede ahorrar mucho tiempo y mejorar la precisión de las curvas.

A partir del stock primario se preparan soluciones de menor concentración (que estén dentro del rango lineal de respuesta del detector), tantas como puntos de calibración vayan a tener las curvas. (se puede trabajar elaborando mezclas que estén entre el rango de 10 – 300 pg/ μ l en concentración para cada compuesto). Estas soluciones que van a ser inyectadas al cromatógrafo deben utilizar nC10 como solvente.

Con los reportes del equipo emplear una regresión lineal para determine la pendiente (m) y el intercepto (b) de la curva de calibración para el compuesto i. ($Y = mX+b$).

$$\text{Área} = C_i * m + b$$

$Y = \text{Área} =$ Área del pico reportado por el cromatograma

$X = C_i =$ Concentración del compuesto i en el extracto (pg/ μ l)

$b =$ Intercepto

El INVEMAR cuenta con un cromatógrafo de gases Perkin – Elmer modelo Auto System con detector ECD, el cual opera bajo las siguientes condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos organoclorados:

Columna capilar SPB-1.

Temperatura del inyector: 220 °C

Temperatura del detector: 310 °C

Flujo del gas auxiliar (N_2): 60 ml/min

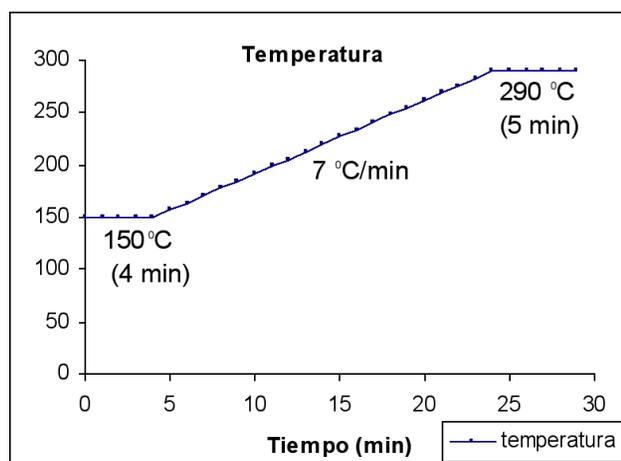
Flujo del gas de arrastre: 1.5 ml/min

Temperatura del horno:

Inicial: 150°C (4 min)

Final: 290 °C (5 min)

Rata: 7°C/min



3.6 Cálculos

Identificados los picos del cromatograma, con las áreas reportadas se procede a calcular la concentración del compuesto i en el extracto, de la siguiente forma:

$$C_i = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

$Y = \text{Área} =$ Área del pico reportado por el cromatograma

$X = C_i =$ Concentración de la sustancia i en el extracto (pg/ μ l)

$b =$ Intercepto

$m =$ Pendiente de la curva de regresión

La concentración de la sustancia i en la muestra sería:

$$\text{ng/l} = \frac{C_i \times V_e \times 0.001}{V}$$

$C_i =$ Concentración de la sustancia i en el extracto de muestra (pg/ μ l)

$V_e =$ Volumen final del extracto (25 μ l)

$V =$ Volumen de muestra sometida a análisis (l)

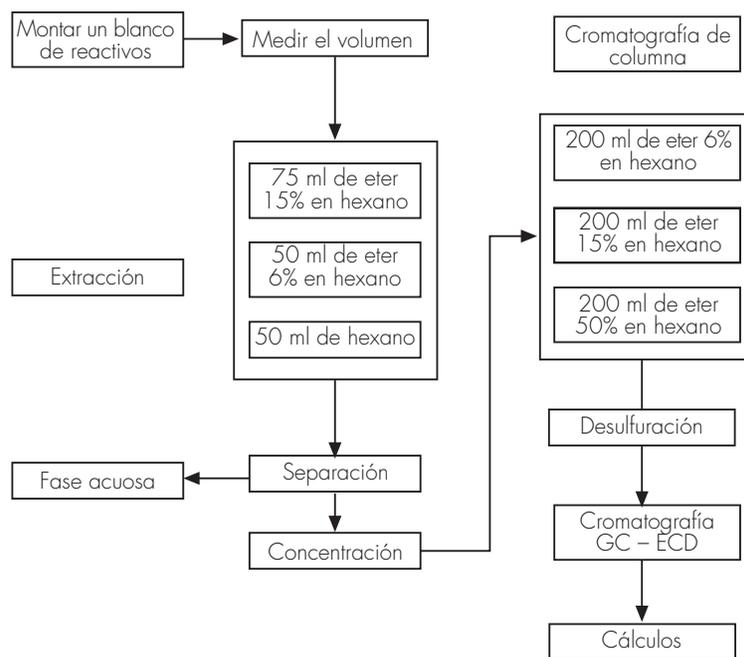
Recomendaciones

Algunas consideraciones que se deben tener con las mezclas de referencias son:

- No debe haber ningún compuesto presente con una concentración, que esté por fuera del rango de linealidad del detector de captura de electrones

- Se debe usar una balanza de alta precisión y papel aluminio como pesasustancias, suficientemente seco y limpio
- Al pesar los estándares se debe tener en cuenta su pureza, la cual viene certificada; y al final se realizarán las correcciones pertinentes con dicho valor
- Se debe tener cuidado en la disolución y trasvasado de los estándares primarios, puesto que cualquier pérdida ocasiona grandes errores
- Todo material de vidrio a utilizar, debe enjuagarse con los solventes y secarse perfectamente.
- Las mezclas estándares se pueden transvasar del matraz volumétrico a recipientes de vidrio adecuados para su almacenamiento
- Las mezclas estándar deben guardarse refrigeradas y perfectamente selladas
- Las mezclas no pueden pasar un periodo máximo de seis meses y los estándares stock concentrados de nueve

3.7 Diagrama de flujo



3.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

ICA. 1991. Manejo de muestras y técnicas de análisis para la determinación de residuos

de plaguicidas. Supervisión y control de calidad de pesticidas. Ministerio de Agricultura/ICA Tibaitata.

US. EPA. 1980. Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Human and Environmental Samples. Environmental Protection Agency, EPA-600/8-80-038, Health Effects Research Lab. Research Triangle Park, NC.

4. Determinación de plaguicidas organoclorados en sedimentos (método EPA, 1980)

Este método describe la determinación de DDTs y PCBs en organismos y sedimentos marinos por medio de Cromatografía de Gases (CG). Otros pesticidas halogenados y compuestos orgánicos que capturen electrones, pueden estar presentes en estas muestras y muchos de estos podrían ser determinados por este método, sin embargo, no todos los residuos son estables al procedimiento de limpieza aplicado al análisis de PCBs y DDTs.

Es utilizado para la determinación de plaguicidas organoclorados absorbidos en sedimentos marinos y estuarinos; las muestras pueden abarcar tanto el subsuelo marino, como las playas. Si se requiere un estudio más detallado, se debe separar las muestras en dos fracciones, mayor y menor a 63 μm .

El método se fundamenta en una extracción sólido - líquido continua de los plaguicidas con hexano-acetona (1:1). El extracto obtenido se concentra y se pasa por una columna empacada con Florisil para ser fraccionado mediante la elución con éter - hexano en diferentes proporciones. Los extractos son luego concentrados y analizados por cromatografía de gases usando detector ECD.

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de sedimentos marinos o continentales. El rango óptimo de trabajo es 10^{-9} – 10^{-12} g, dado por la linealidad del detector. La mínima concentración que puede ser detectada es de 10^{-12} g y los siguientes compuestos pueden determinarse por este método: Clordano, α -BHC, β -BHC, Lindano, Heptacloro, Epoxido, p,p'- DDE, o,p'- DDE, Dieldrin, Endrin, o,p'-DDD, o,p'-DDD, o,p'-DDT.

4.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las muestras se recolectan con una draga metálica tipo Van Veen, conos o cucharas, de donde se empacan en bolsas plásticas para ser transportadas al laboratorio. La mejor forma de almacenar y preservar la muestra es secándola; y para esto el mejor procedimiento es la liofilización (secado a bajas temperaturas), y el almacenamiento en un medio exento de humedad. Si el análisis inmediato no es posible, y tampoco se cuenta con un equipo liofilizador, es conveniente secarla en estufa a 40 °C hasta que la muestra esté libre de humedad. Posteriormente, se almacena en bolsas plásticas o en papel aluminio, asegurándose de mantenerlas en un desecador. Otra alternativa muy eficaz es mantener congeladas las muestras a -20°C, envueltas en papel aluminio dentro de bolsas plásticas por un periodo no mayor a 15 días.

4.2 Materiales y equipos

Cromatógrafo de gases equipado con Detector de Captura Electrónica (ECD)
 Equipo de extracción Soxhlet
 Rotavaporador
 Concentrador Kuderna Danish
 Balanza analítica precisión +/- 0.00001 g
 Horno para secado
 Plancha de calentamiento
 Beakers de Pyrex de 100, 150, 200 y 1000 ml
 Probetas graduadas de 50, 100 y 250 ml
 Erlenmeyers de 125 y 250 ml
 Columna de vidrio 25 cm de largo x 1 cm de diámetro interno con llave de teflón
 Pipetas Pasteur
 Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, y 10 ml
 Matraz aforado de 25, 50 y 100 ml
 Microjeringas de 10 μl

Desecadores
Viales de 2 o 5 ml con tapa rosca de teflón

4.3 Reactivos

Gas nitrógeno (N₂) grado 4.5
n-Hexano calidad pesticida
n-Decano, R.A
Eter etílico, R.A
Acetona, R.A
Metanol calidad pesticida
Florisil PR, 60 - 100 Mesh
Acido sulfúrico concentrado, libre de Hidrocarburos clorados (HC)
Sulfato de sodio anhidro
Dicromato de potasio
Estándares de pesticidas (Hidrocarburos clorados)

Precaución. Los compuestos estándares son altamente tóxicos y deben ser manejados con extremo cuidado para evitar contacto con la piel o inhalación.

4.4 Procedimiento

Extracción

- Si la muestra es húmeda pesar de 5 a 7 g (sedimento húmedo), y mezclar con tres veces su peso de sulfato de sodio anhidro, hasta que parezca estar seca; transferir la mezcla al vaso del soxhlet
- Colocar en el balón del equipo soxhlet 150 ml de una mezcla de acetona - n-hexano (1:1), y unos cuerpos de ebullición
- Extraer en el aparato soxhlet por 8 horas, a una razón de 4 ó 5 veces de vaciado por hora
- Extraer la misma cantidad de sulfato de sodio, para el seguimiento del blanco de reactivos

- Trasvasar a un embudo de separación de 250 ml, agregar 150 ml de agua desionizada y agitar fuertemente para retirar la acetona
- Separar las fases, desechar la capa inferior (acetona - agua) y conservar la de hexano
- Lavar la capa hexánica con 150 ml de una solución de sulfato de sodio 2%. Retirar la fase acuosa
- Colocar la fase orgánica en un erlenmeyer de 125 ml, agregar 0.5 g de sulfato de sodio anhidro y dejar en reposo para retirar la humedad
- Concentrar el extracto en rotavapor hasta 2 ml aproximadamente y depositarlo con pipeta Pasteur en viales pequeños (2 ó 5 ml)

Preparación de la columna de Florisil

- La cromatografía de columna se prepara empleando una columna de vidrio de 25 cm de alto y de 1.0 cm de diámetro interno
- Enjuagar las columnas para fraccionar con acetona y colocar en la estufa a 110°C
- En el extremo inferior, fijar una pieza de lana de vidrio, para retener el adsorbente
- Mezclar 16 g de Florisil con 30 ó 40 ml de n-hexano los cuales son vertidos a la columna, adicionar 1.0 cm de sulfato de sodio sobre el nivel de Florisil, para evitar disturbios en la primera capa cuando los solventes son vertidos a la columna. Terminado esto, eluir 50 ml de n-hexano como lavado

Purificación en columna de Florisil

Especialmente en muestras de sedimentos y organismos, es necesario purificar el extracto antes de proceder con el análisis. La limpieza y separación son logrados por medio de cromatografía de partición, como sigue:

- Concentrar el extracto en Kuderna Danish o baño María hasta 0.5 ml
- Percolar el extracto en una columna de Florisil.
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 6%
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 15%
- Reunir los dos eluidos anteriores en un erlenmeyer de 100 ml
- Eluir con 200 ml de éter en hexano al 50%. Recibir en otro erlenmeyer
- Colocar alambre de cobre o mercurio metálico para la desulfuración, hasta que no se aprecie la precipitación de los sulfuros sobre el metal
- Concentrar en rotavapor hasta 2 ml
- Almacenar el extracto en un vial de vidrio de 5 ml para su análisis final por cromatografía de gases

Purificación con ácido sulfúrico concentrado

- Concentrar el extracto en baño María hasta 0.5 ml
- Transvasar el extracto a un tubo de 10 ml con tapa rosca
- Adicionar 1 ml de H₂SO₄ concentrado, agitar vigorosamente por 30 segundos
- Dejar en reposo hasta la separación de las fases
- Enjuagar con 20 ml de n-hexano
- Retirar con una pipeta Pasteur la fase ácida. Repetir el proceso hasta que la fase orgánica sea clara y completamente traslúcida
- Lavar el extracto con agua desionizada, agitar y retirar la fase acuosa
- Adicionar suficiente cobre o mercurio metálico para desulfurar el extracto
- Adicionar 0.5 g de Na₂SO₄ anhidro para secar el extracto
- Almacenar el extracto en un vial de vidrio de 5 ml para su análisis final por cromatografía de gases

Si el análisis cromatográfico no se realiza inmediatamente, mantener refrigerados los extractos a +/- 2°C y protegidos de la luz.

Cuantificación

La cuantificación de cada pesticida se realiza a través de un análisis por cromatografía de gases, los extractos secos de las muestras, se reconstituyen con 25 - 100 µl de n- Decano (nC10) y se inyecta 0.5 µl en el cromatógrafo de gases con detector ECD.

4.5 Calibración

El proceso de calibración es idéntico al descrito en el numeral 3.5.

4.6 Cálculos

Identificados los picos del cromatograma, con las áreas reportadas se procede a calcular la concentración del compuesto *i* en el extracto, de la siguiente forma:

$$C_i = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

Y = Área = Área del pico reportado por el cromatograma

X = C_i = Concentración de la sustancia *i* en el extracto pg/µl

b = Intercepto

m = Pendiente de la curva de regresión

La concentración de la sustancia *i* en la muestra sería:

$$\text{ng/g} = \frac{\text{Ci} \times \text{Ve} \times 0.001}{\text{W}}$$

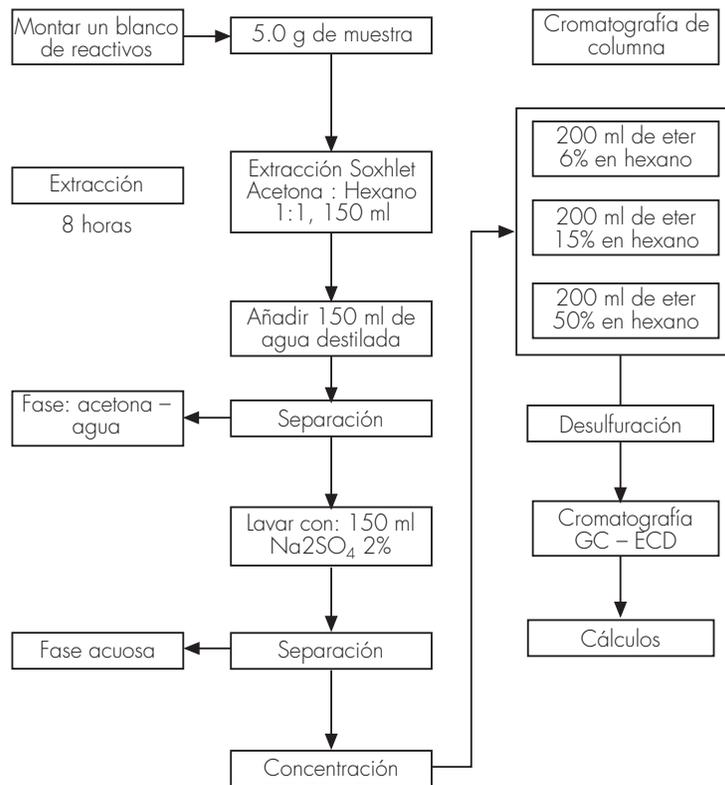
Ci = Concentración de la sustancia i en el extracto de muestra (pg/μl)
 Ve = Volumen final del extracto (50 μl)
 W = Peso de muestra seca sometida a análisis (g)

Recomendaciones

Son válidas de igual forma las recomendaciones dadas en el numeral 3.6.

Es necesario llevar un blanco de reactivos a través de todos los pasos del método.

4.7 Diagrama de flujo



4.8 Bibliografía de consulta

US. EPA. 1980. Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Human and Environmental Samples. Environmental Protection Agency, EPA-600/8-80-038, Health Effects Research Lab. Research Triangle Park, NC.

ICA. 1991. Manejo de muestras y técnicas de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas. Supervisión y control de calidad de pesticidas. Ministerio de Agricultura/ICA Ti-baitata.

5. Determinación de plaguicidas organoclorados en organismos (método EPA, 1980)

El método consiste en una extracción sólido - líquido continua de los plaguicidas con acetonitrilo a temperatura ambiente y agitación constante. El extracto obtenido se concentra y se purifica con Florisil o con ácido sulfúrico concentrado, para luego ser concentrado y analizado por cromatografía de gases usando detector ECD.

Alcance y aplicación

El método es aplicable para la mayoría de las muestras de biopsias y tejidos de vida salvaje (peces, aves y animales pequeños). Se pueden analizar tejidos y órganos como el hígado, tejido muscular, riñón, tejido suprarrenal y gónadas.

El rango óptimo de trabajo es 10^{-9} – 10^{-12} g, dado por la linealidad del detector. La mínima concentración que puede ser detectada es de 10^{-12} g y los siguientes compuestos pueden determinarse por este método: Clordano, α -BHC, β -BHC, Lindano, Heptacloro, Epoxido, p,p' - DDE, o,p' - DDE, Dieldrin, Endrin, o,p'-DDD, o,p'-DDD, o,p'-DDT.

5.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las muestras se toman con una red mediante arrastre por un tiempo determinado o con redes y anzuelos a bordo de una embarcación. Los ejemplares capturados se clasifican y empaquetan en bolsas limpias de polietileno. El material orgánico se debe transportar refrigerado al laboratorio.

Si el análisis no se realiza inmediatamente, las muestras deben envolverse en papel aluminio y

almacenarse congeladas entre -10 y -20 °C, por un periodo no mayor de 60 días. Las muestras no deben ser almacenadas en lugares que estén guardando estándares para evitar la contaminación.

5.2 Materiales y equipos

Cromatógrafo de gases equipado con Detector de Captura Electrónica (ECD)
 Balanza analítica precisión +/- 0.00001 g
 Centrifuga
 Rotavaporador
 Concentrador Kuderna Danish
 Horno para secado
 Plancha de calentamiento
 Beakers de Pyrex de 100, 150, 200 y 1000 ml
 Probetas graduadas de 50, 100 y 250 ml
 Erlenmeyers de 125 y 250 ml
 Tubos de centrifuga de 50 ml
 Columna de vidrio 25 cm de largo x 1 cm de diámetro interno con llave de teflón
 Pipetas Pasteur
 Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, y 10 ml
 Matraz aforado de 25, 50 y 100 ml
 Microjeringas de 10 μ l
 Desecadores
 Viales de 2 ó 5 ml con tapa rosca de teflón.

5.3 Reactivos

Gas nitrógeno (N_2) grado 4.5
 n-Hexano calidad pesticida
 n-Decano R.A.
 Eter etílico, R.A.
 Acetona R.A.
 Acetonitrilo R.A.
 Metanol calidad pesticida
 Florisil PR, 60 - 100 Mesh
 Acido sulfúrico concentrado, libre de Hidrocarburos clorados (HC)

Sulfato de sodio anhidro

Estándares de pesticidas (Hidrocarburos clorados)

Precaución. Los compuestos estándares son altamente tóxicos y deben ser manejados con extremo cuidado para evitar contacto con la piel o inhalación.

5.4 Procedimiento

Extracción

- Si el material orgánico ha sido congelado se debe descongelar y esperar a que alcance la temperatura ambiente
- Pesarse exactamente entre 2 – 5 g de muestra
- Tomar una submuestra para la determinación de humedad
- Extraer la misma cantidad de sulfato de sodio, para el seguimiento de blanco de reactivos
- Colocar en una licuadora con 20 ml de acetonitrilo y homogenizar por 5 min
- Poner en agitación constante a temperatura ambiente por 3 minutos
- Centrifugar la muestra y recuperar el extracto
- Repetir la extracción dos veces más, colectando los sobrenadantes en un erlenmeyer
- Transvasar el extracto a un embudo de separación de 250 ml
- Agregar 250 ml de solución acuosa de Na_2SO_4 al 2%, agitar fuertemente y dejar en reposo por 10 minutos
- Extraer la mezcla de acetonitrilo acuoso con una porción de 50 y dos de 20 ml de hexano. Combinar los extractos en un erlenmeyer, adicionar Na_2SO_4 anhidro. Agitar y dejar en reposo
- Concentrar el extracto en rotavapor hasta 2 ml aproximadamente y depositarlo con pipeta Pasteur en viales pequeños

Preparación de la columna de Florisil

- La cromatografía de columna se prepara empleando una columna de vidrio de 25 cm de alto y de 1.0 cm de diámetro interno
- Enjuagar las columnas para fraccionar con acetona y colocar en la estufa a 110°C
- En el extremo inferior, fijar una pieza de lana de vidrio, para retener el adsorbente
- Agregar 16 g de Florisil y adicionar 1.0 cm de sulfato de sodio sobre el nivel de Florisil
- Lavar la columna haciendo pasar 50 ml de n-hexano, seguido de 50 ml de metanol
- Dejar secar a temperatura ambiente por una hora, y calentarlas en horno a 130 °C por una noche antes de utilizarlas
- Después de 12 horas sacar las columnas y dejarlas reposar a temperatura ambiente

Purificación en columna de Florisil

- Una vez esté fría la columna de fraccionamiento, prehumedecerla con 10 ml de hexano. Este hexano se desecha
- Transferir el extracto concentrado a la parte superior de la columna de Florisil con la ayuda de una pipeta Pasteur. Simultáneamente, comenzar a recoger el eluyente en un erlenmeyer
- Enjuagar el vial donde estaba el extracto con hexano y agregar los enjuagues a la columna; repetir este procedimiento dos veces
- Eluir utilizando 12 ml de hexano seguido por 12 ml de metanol al 1% en hexano. Estos 24 ml representan la fracción F1 y contendrán: heptacloro, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT, y p,p'-DDT; también pueden aparecer en pequeñas cantidades: p,p'-DDD y a-BHC
- Colectar una segunda fracción F2, por elución de otros 12 ml de metanol al 1% en hexano. Esta fracción contendrá: a-BHC, lindano, heptacloro epóxido, dieldrin, endrin y p,p'-DDD

- Concentrar cada fracción en rotavapor hasta 2 ml aproximadamente y depositar con pipeta Pasteur en viales pequeños
- Adicionar suficiente cobre o mercurio metálico para desulfurar el extracto

Cuantificación

La cuantificación de cada pesticida se realiza a través de un análisis por cromatografía de gases; los extractos secos de las muestras, se reconstituyen con 25 - 100 μ l de n-Decano (nC10), y se inyecta 0.5 μ l en el cromatógrafo de gases con detector ECD.

5.5 Calibración

El proceso de calibración es idéntico al descrito en el numeral 3.5.

5.6 Cálculos

Identificados los picos del cromatograma, con las áreas reportadas se procede a calcular la concentración del compuesto *i* en el extracto, de la siguiente forma:

$$C_i = \frac{\text{Área} - b}{m}$$

Y = Área = Área del pico reportado por el cromatograma

X = C_i = Concentración de la sustancia *i* en el extracto (pg/ μ l)

m = Pendiente de la curva de regresión

b = Intercepto

La concentración de la sustancia *i* en la muestra sería:

$$\text{ng/g} = \frac{C_i \times V_e \times 0.001}{W}$$

C_i = Concentración de la sustancia *i* en el extracto de muestra (pg/ μ l)

V_e = Volumen final del extracto (50 μ l)

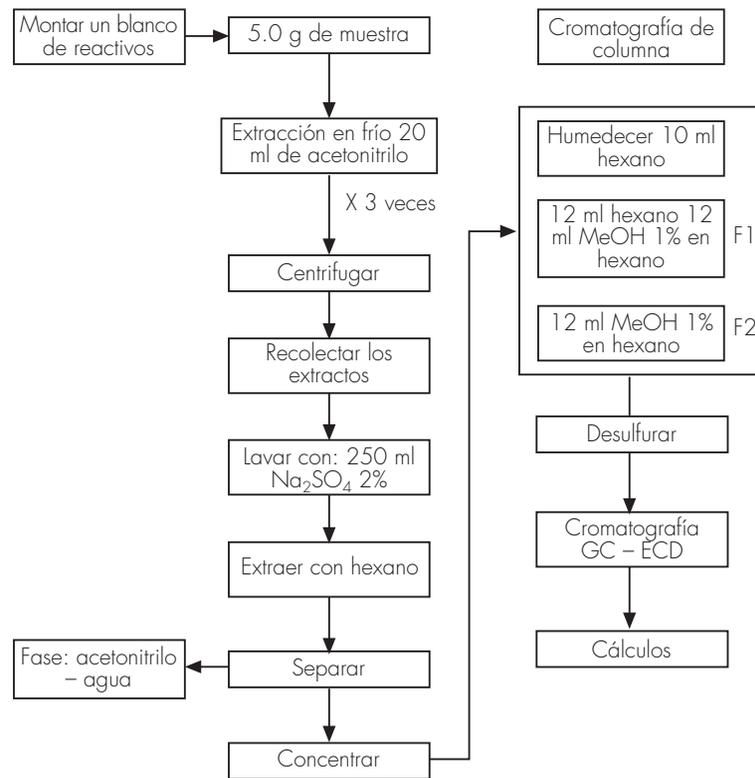
W = Peso de muestra seca sometida a análisis (g)

Recomendaciones

Son validas de igual forma las recomendaciones dadas en el numeral 3.6

Se debe llevar un blanco de reactivos a través de todos los pasos del método.

5.7 Diagrama de flujo



5.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

US. EPA. 1980. Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Human and Environmental Samples. Environmental Protection Agency, EPA-600/8-80-038, Health Effects Research Lab. Research Triangle Park, NC.

ICA. 1991. Manejo de muestras y técnicas de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas. Supervisión y control de calidad de plaguicidas. Ministerio de Agricultura/ICA Tibaitata.

6. Determinación de plaguicidas organoclorados (métodos referencia unesco, 1996)

La metodología propuesta por la UNESCO para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados se basa en los mismos principios descritos en el numeral 3. Se lleva a cabo un proceso de extracción de los analitos de interés, con solventes orgánicos, uno de concentración del extracto, uno de limpieza por cromatografía de columna; y uno extra de desulfuración para muestras de sedimentos.

Básicamente la metodología de recolección de muestras, materiales, equipos y reactivos establecidos, son los mismos que se enunciaron en los numerales 3, 4 y 5. Las diferencias de esta meto-

dología por la propuesta por la EPA radican en que emplean el método de estándar interno que se utiliza para la cuantificación final, y en las anotaciones que se dan a continuación.

6.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Ver numerales 3.1, 4.1 y 5.1.

6.2 Materiales y equipos

Ver numerales 3.2, 4.2 y 5.2.

6.3 Reactivos

Ver numerales 3.3, 4.3 y 5.3.

6.4 Procedimiento

6.4.1 Aguas

Extracción: Se lleva a cabo una extracción líquido – líquido de la muestra, empleando como solvente diclorometano puro con un volumen de 120 ml de solvente por litro de muestra. Este proceso de extracción se repite tres veces.

Purificación: La purificación se realiza con columnas cromatográficas de silicagel/alúmina (10 g de alúmina y 20 g de sílica gel). Los eluyentes empleados son:

- F1: 50 ml de pentano
- F2: 200 ml de diclorometano/pentano 1 : 1

6.4.2 Sedimentos

Extracción: Se realiza una extracción Soxhlet del sedimento con 200 ml de diclorometano puro, durante un periodo de 4 – 12 horas.

Purificación: La purificación se efectúa con columnas cromatográficas de silicagel/alúmina (10 g de alúmina y 20 g de sílica gel); en el tope de la columna se adiciona cobre activado con HCl para la desulfuración de la muestra.

Los eluyentes empleados son:

- F1: 50 ml de pentano
- F2: 200 ml de diclorometano/pentano 1 : 1

6.4.3 Organismos

Extracción: Los analitos de interés se extraen macerando la muestra con 100 ml de diclorometano puro, durante un periodo de 3 minutos, se centrifuga la muestra y el extracto sobrenadante se recolecta. Este procedimiento se repite tres veces.

Purificación: La purificación se lleva a cabo con columnas cromatográficas de silicagel/alúmina (10 g de alúmina y 20 g de sílica gel).

Los eluyentes empleados son:

- F1: 50 ml de pentano
- F2: 200 ml de diclorometano/pentano 1 : 1

6.5 Calibración

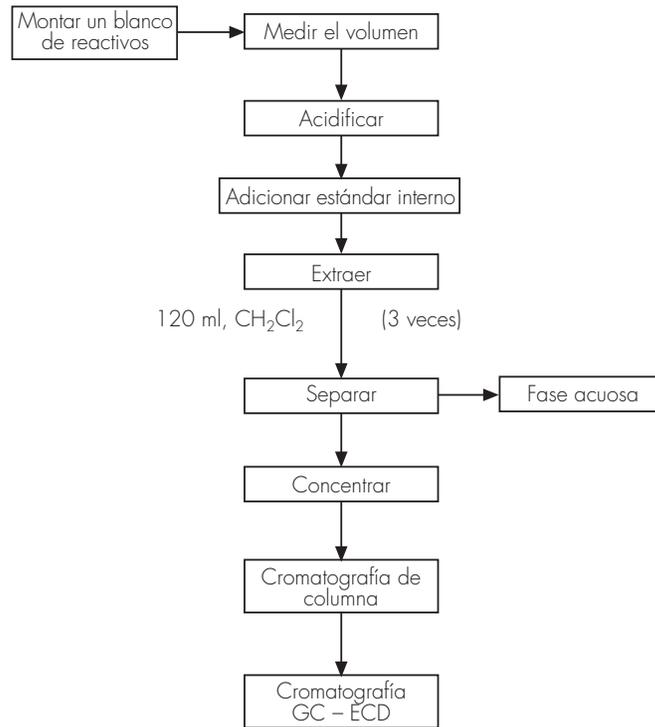
Ver numeral 3.5.

6.6 Cálculos

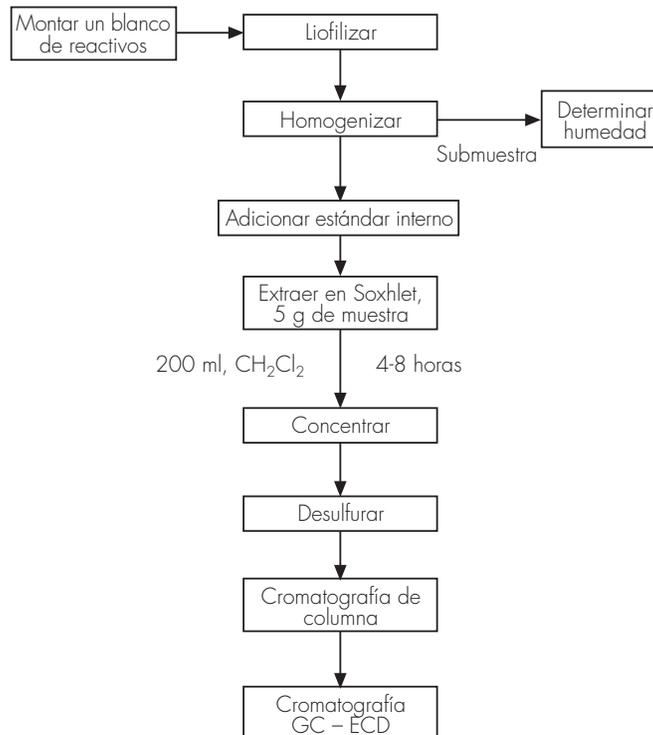
Ver numerales 3.6, 4.6 y 5.6.

6.7 Diagramas de flujo

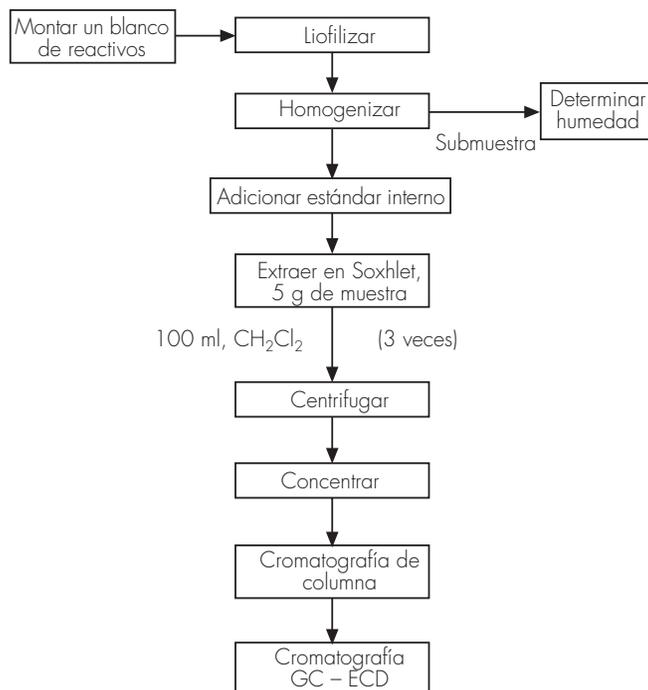
ORGANOCOLORADOS EN AGUAS – UNESCO



ORGANOCOLORADOS EN SEDIMENTOS – UNESCO



ORGANOCOLORADOS EN ORGANISMOS – UNESCO



6.8 Bibliografía de consulta

UNESCO. 1996. Use of Standards and Reference Materials in the Measurement of Chlorinated Hydrocarbon Residues, Chemistry Workbook. Intergovernmental Oceanographic Commission. Technical series.

7. Determinación de metales en aguas (EPA, 1980)

De acuerdo con su concentración, los efectos de los metales en aguas naturales y residuales varían desde beneficiosos hasta peligrosamente tóxicos. Algunos metales son esenciales, otros afectan adversamente a los consumidores del agua, a los sistemas de tratamiento y a las aguas receptoras.

En el ambiente acuático, los metales se encuentran ya sea en forma de especies solubles (iones hidratados o complejos metálicos con ligandos orgánicos) o en forma de material particulado insoluble (material coloidal o complejos metálicos absorbidos por material en suspensión). En estas condiciones, es obvio que su estado químico tenga una marcada influencia sobre el procedimiento analítico. Pueden determinarse adecuadamente por métodos instrumentales o colorimétricos. Existe una mayor aceptación por los métodos instrumentales debido a que son rápidos y los efectos matrices a menudo son controlables sin muchos procesos de separación. Para cualquier método que se aplique, se recomienda el pretratamiento específico de las muestras, de acuerdo con los resultados que se quiera alcanzar a través de la determinación.

Las extracciones con metil isobutil cetona (MIBK) y ditiocarbamato de pirrolidín amonio (APDC) son particularmente usadas cuando hay interferencias de una matriz salina, por ejemplo, en el agua de mar. Este procedimiento también concentra la muestra hasta los límites de detección que son requeridos (APHA, 1998).

En la cuantificación final de cada metal se emplean dos técnicas analíticas: la espectrofotometría de absorción y la de emisión atómica.



Equipo de emisión atómica ICP, Spectro Flame Modula, utilizado para la determinación de metales pesados

La espectrofotometría de absorción atómica por llama, cuyo principio es el paso de un haz de luz a través de una llama a un monocromador y a un detector que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento atomizado en la llama. Debido a que cada metal tiene su longitud de onda característica a la cual absorbe, se usan lámparas compuestas del elemento que se está midiendo; esto hace el método relativamente libre de interferencias espectrales. La cantidad de energía absorbida en la llama es proporcional a la concentración del elemento en la muestra sobre un limitado rango de concentración.

En la espectroscopia de emisión atómica inductivamente acoplada – ICPS, la muestra es ato-

mizada dentro de una antorcha de argón, que con ayuda de un campo magnético, induce a la absorción y posterior emisión de energía por los metales en estado iónico. La radiación es analizada con un sistema óptico y fotodiodos. La intensidad de la energía emitida es proporcional a la cantidad de metal en la muestra, además, esta técnica permite la determinación simultánea de varios elementos ya que se establecen las diferentes longitudes de ondas de lectura para los distintos metales presentes.

Alcance y aplicación

Este método permite la extracción de cobre, cadmio, hierro, zinc, plomo, manganeso, plata y cromo +6. Es aplicable a todo tipo de aguas, en especial las marinas, y permite detectar en el extracto concentraciones del orden de 10^{-6} a 10^{-7} g/l del metal en cuestión.

7.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Antes de coleccionar una muestra, debe conocerse la fracción de metal a analizar, pues de ello depende el tratamiento que se le da a la muestra.

Durante el muestreo puede haber contaminación por el instrumental utilizado, presencia de residuos de muestreos previos en los recipientes de muestreo y/o pérdida de metales por absorción y/o precipitación por falta de acidificación de las muestras en el momento oportuno. Los mejores contenedores son recipientes hechos de cuarzo; pero debido a su alto costo, se recomienda el uso de recipientes de polietileno con tapas del mismo material. Debe evitarse el uso de vidriería común y corriente para muestras que contienen metales en el rango de $\mu\text{g/l}$.

Inmediatamente colectadas, las muestras deben acidificarse con ácido nítrico concentrado a pH 2 (usualmente 1.5 ml de ácido nítrico concentrado por litro de muestra son suficientes) para preservación a corto plazo. Para muestras con alta capacidad amortiguadora, deberá aumentarse la cantidad de ácido (pueden ser necesarios hasta 5 ml para muestras muy alcalinas). Utilizar ácido de alta pureza disponible en el mercado.

Después de acidificar las muestras, deben almacenarse en un refrigerador a aproximadamente 4 °C para evitar cambios de volumen debido a la evaporación. Bajo estas condiciones, muestras con concentraciones de varios miligramos son estables durante 6 meses (excepto el mercurio, cuyo límite es 38 días en vidrio y 14 en plástico).

Las muestras que contienen partículas o material orgánico requieren un tratamiento antes del análisis. El análisis de metales totales incluye todos los metales tanto inorgánicos como orgánicamente unidos y tanto disueltos como particulados. En caso de hacer esta determinación, debe digerirse la muestra sin previa filtración.

7.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro de absorción atómica o espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente ICPS

pH-metro

Desionizador de agua

Embudos de separación de 500 y 2000 ml

Beakers de 50, 100 y 250 ml

Erlenmeyers de 125 ml

Pipetas de 2, 5, 10 y 20 ml

Balones aforados de 100 ml

Balanza analítica

Agitador magnético

Botellas colectoras plásticas (Niskin, Nansen)

Botellas plásticas de policarbonato, polipropileno o polietileno

7.3 Reactivos

Agua libre de metales: Preparar desionizando el agua o dependiendo de la concentración de metal en la muestra, por destilación y/o bidestilación. Debe chequearse para verificar la ausencia del elemento de interés en esta agua.

Ácido nítrico 4N: Diluir 251 ml de ácido nítrico concentrado a 1 l con agua desionizada.

Solución de ditiocarbamato de pirrolidín amonio al 1% (APDC; $C_5H_{12}N_2S_2$): Disolver 10.0 g de APDC en 600 ml de agua, completar 1 l y guardar refrigerado.

Hidróxido de amonio

Ácido clorhídrico concentrado

Ácido nítrico concentrado

Metilisobutilcetona (MIBK; $C_6H_{12}O$)

Argón ultrapuro grado 5.0 (ICP)

Acetileno y aire (absorción atómica)

Soluciones de referencia para cada metal (1 g/l)

7.4 Procedimiento

- Medir 500 ml de muestra en un vaso de precipitado
- Ajustar el pH en 4.0 + 0.1 con NH_3 25%, NH_4OH (10%) y HNO_3 (10%)
- Colocar 5 ml de APDC 1% en un embudo de separación 1l
- Agregar la muestra al embudo de separación (500 ml) y agitar durante 30 segundos
- Adicionar 20 ml de MIBK y agitar por 3 minutos
- Dejar reposar hasta observar la separación completa de las fases

- Desechar la fase acuosa y transferir la fase orgánica a un embudo de separación de 100 ml
- Adicionar al extracto orgánico 12.5 ml de HNO₃ 4N y agitar nuevamente durante 2 minutos
- Después de que las fases hayan separado, desechar la fase orgánica y conservar en frascos plásticos la fase ácida hasta posterior análisis
- Realizar el mismo procedimiento a por lo menos a un blanco de reactivos
- Efectuar la cuantificación de cada metal por absorción atómica o por espectroscopía de emisión atómica Inductivamente acoplada

7.4.1 Método de la adición de un patrón

Este método se utiliza ampliamente en espectroscopía de absorción atómica y consiste en:

- Transferir dos o más alícuotas de la muestra a matraces aforados
- Diluir una de las muestras al volumen previsto y obtener la absorbancia de la solución
- Agregar a la segunda alícuota una cantidad conocida del analito y luego de diluir al mismo volumen que la anterior, medir su absorbancia. También se pueden obtener datos para otras adiciones de concentraciones conocidas de analito

7.5 Calibración

Debido a las diferencias entre manufacturas y modelos de espectrofotómetro de absorción, y de emisión atómica (ICPS), es imposible formular instrucciones para el manejo de cada equipo, por lo tanto, se deberá remitir al manual de operaciones suministrado por el fabricante. En forma general, la calibración de uno u otro requiere de la elaboración de curvas de calibración para cada metal que se desea analizar.

A partir de un patrón primario, por ejemplo, de 1000 ppm, preparar soluciones de cada metal, de diferentes concentraciones para realizar una curva de calibración; siguiendo el procedimiento antes descrito, las soluciones de calibración deben prepararse en HNO₃ 4N, para el caso de aguas.

7.6 Cálculos

Determinar la concentración de cada metal, en miligramo por litro, refiriéndose a la curva de calibración correspondiente.

$$C_m = \frac{C_e \times V_e}{V_m}$$

C_m = Concentración de la muestra (mg/l o ppm)

C_e = Concentración del extracto (µg/ml)

V_m = Volumen de muestra (ml)

V_e = Volumen del extracto (ml)

7.6.1 Método de la adición de un patrón

Obtenidos los resultados de absorbancia, si existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, se aplica la siguiente ecuación:

$$C_x = C_s \frac{A_x}{(A_t - A_x)}$$

C_x , = Concentración del analito en la muestra diluida

C_s = Contribución del analito agregado como patrón

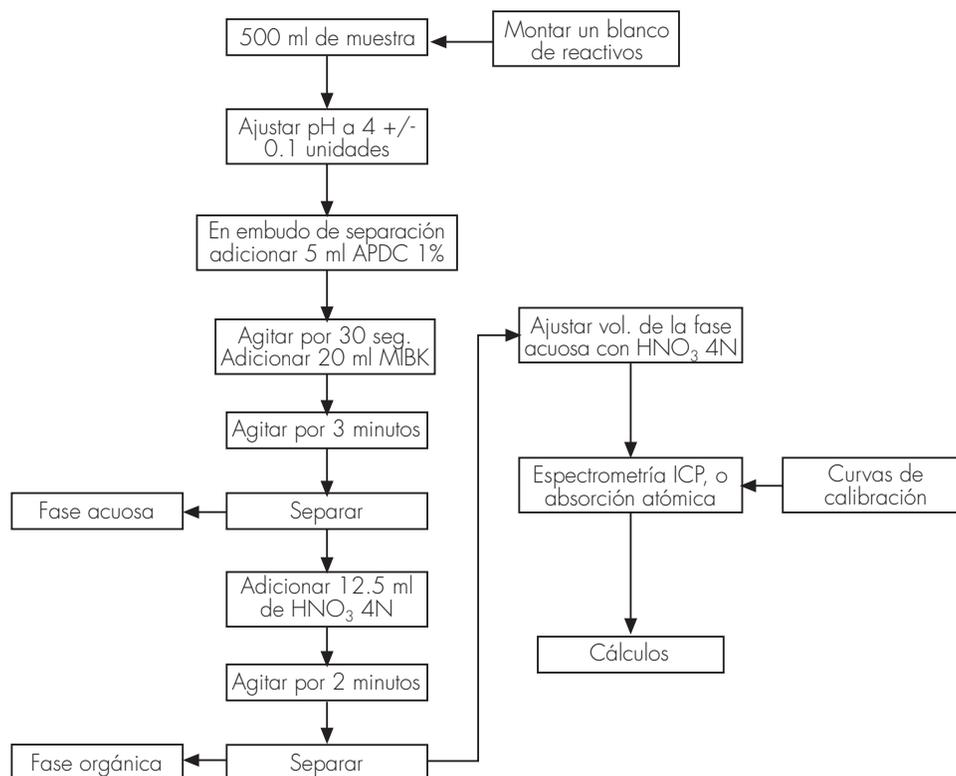
A_x , A_t = Absorbancias medidas

Si se realizan varias adiciones, se puede graficar A_t en función de C_s . La recta resultante se puede

extrapolar a $A_t = 0$. La sustitución de este valor en la ecuación anterior revela que en la intersección $C_x = -C_s$.

El método de la adición del patrón tiene la ventaja que tiende a compensar las variaciones debidas a las interferencias físicas y químicas en la solución de la muestra.

7.7 Diagrama de flujo



7.8 Bibliografía de consulta

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 3-1 pp.

FAO. 1975. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Parte 1. FAO fish. Teach. Paper No. 137.

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

US. EPA. 1980. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. Environmental Protection Agency, EPA-600. Cincinnati, Ohio.

8. Determinación de metales en sedimentos

Los metales asociados a la materia orgánica deben convertirse a una forma en la que puedan leerse por espectroscopía. Para esta digestión puede usarse ácido nítrico, ácido sulfúrico o ácido nítrico - perclórico, pero deberá reportarse la técnica de digestión aplicada.

En los sedimentos los metales pueden constituir varias fracciones, por tal motivo el análisis de la muestra puede realizarse por duplicado: una digestión débil en la fracción total del sedimento con el fin de obtener los metales biodisponibles y una extracción fuerte para determinar el contenido total en el grano.

El método aquí descrito involucra una extracción con HCl 0.1N; agitación por 24 horas y determinación cuantitativa por una técnica espectrométrica (Absorción o Emisión Atómica Inductivamente Acoplada - ICPS).

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a todo tipo de sedimento marino o continental y permite detectar en el extracto concentraciones del orden de 10^{-6} a 10^{-7} g/l del metal en cuestión.

8.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las muestras de sedimento, según las facilidades con que cuente el laboratorio se colectan con cono o corazonadores plásticos y se transfieren luego a bolsas de polietileno convenientemente rotuladas. Si sólo se dispone de dragas, la muestra debe colectarse usando cucharas plásticas y tomando de

la parte central el sedimento que no ha tenido contacto con las paredes de metal.

Las muestras se deben transportar al laboratorio bajo refrigeración.

La mejor forma de almacenar y preservar la muestra es secándola en liofilizador y almacenarla en un medio exento de humedad. Si el análisis inmediato no es posible, y tampoco se cuenta con un equipo liofilizador es conveniente homogenizar la muestra y colocarla en cajas petri tratadas con HNO_3 10% y secar a 60°C hasta peso constante. Estando la muestra libre de humedad, se almacena en bolsas plásticas. Previamente se tamizan a través de una malla de $63\ \mu\text{m}$. Sólo la fracción menor a $63\ \mu\text{m}$ se utiliza para estudios ambientales.

Para el análisis de Hg, As y Pb se seca la muestra sólo con liofilizador.

8.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro de absorción atómica o espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente ICPS

pH-metro

Sistema de secado al vacío (liofilizador)

Desionizador de agua

Sistema para tamizado, tamiz de $63\ \mu\text{m}$

Embudos de separación de 500 y 2000 ml

Beakers de 50, 100 y 250 ml

Erlenmeyers de 125 ml

Pipetas de 2, 5, 10 y 20 ml

Balones aforados de 100 ml

Balanza analítica

Agitador magnético

Cajas de petri

Cucharas plásticas

Sistema de secado al vacío (liofilizador)

Papel filtro Wathman # 40

8.3 Reactivos

Agua libre de metales

Ácido clorhídrico concentrado

Ácido nítrico concentrado

Ácido Perclórico concentrado – HClO_4 ; usar grado suprapuro o analítico

Hidróxido de amonio

Argón ultrapuro grado 5.0 (ICP)

Acetileno y aire (Absorción atómica)

Soluciones de referencia para cada metal (1g/l)

8.4 Procedimiento

8.4.1 Metal biodisponible (Extracción débil)

- Pesar entre 1 y 3 g de muestra aproximadamente y transferirla a un erlenmeyer limpio y seco
- Agregar por cada gramo de muestra, 15 ml de solución de HCl 0.1 N
- Colocar en agitación por 24 horas
- Filtrar la muestra con embudos de plástico o vidrio y papel filtro Wathman # 40
- Colectar el filtrado en balones volumétricos
- Completar el volumen con solución de HCl 0.1 N
- Preparar un blanco reactivo de igual manera que la muestra
- Cuantificar por espectrometría

8.4.2 Metales totales (Extracción fuerte)

- Pesar 0.4 g de sedimento seco y tamizado
- Agregar 3.0 ml de HNO_3 concentrado (usar cámara de extracción)
- Adicionar 1 ml de HClO_4 concentrado
- Dejar reaccionar y calentar a 100°C por 16 horas. en plancha de calentamiento
- Filtrar en membranas Wathman # 40 o centrifugar

- Recuperar el filtrado en balones aforados de 10 ml
- Completar a volumen con HCl 0.1N
- Preparar un blanco reactivo de igual manera que la muestra
- Cuantificar por Espectrometría de Absorción o de Emisión Atómica (ICP)

8.4.3 Procedimiento para las extracciones secuenciales de A. Tessier

Este procedimiento busca diferenciar el contenido de metales en cada una de las fracciones de asociadas al sedimento, a través, de pasos que se ejecutan secuencialmente (de allí el nombre); con ellos se busca transferir los metales presentes en el sedimento (sólido) a una fase líquida a fin de efectuar su cuantificación. Para que los resultados sean satisfactorios todo el procedimiento debe realizarse el mismo día.

Fracción intercambiable

- Extraer en un tubo de ensayo un gramo (1.0 g) de muestra con 10 ml de solución 1 N de MgCl_2 a pH 7.0 a temperatura ambiente
- Mantener agitación continua por 10 minutos
- Centrifugar a alta velocidad, preferiblemente 5000 rpm
- Analizar el contenido de metales asociados a esta fracción en el líquido sobrenadante

Metales asociados a carbonatos

- Tratar durante 5 horas el residuo sedimentable obtenido durante la extracción anterior con 10 ml de solución de acetato de sodio 1 M
- Ajustar el pH a 5.0 con ácido acético
- Mantener agitación permanente durante el tiempo que dure la extracción
- Centrifugar y separar la fase líquida

- Determinar el contenido de metales a la solución, los cuales representan los asociados a carbonatos

Fracción de metales asociados a óxidos de hierros y manganeso

- Extraer el residuo anterior con 20 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 0.04 M en ácido acético al 25% (v/v)
- Calentar a $96 \pm 3^\circ\text{C}$ durante dos horas agitando ocasionalmente
- Centrifugar y separar la fase líquida
- Realizar la cuantificación de los metales en el líquido

Metales asociados a materia orgánica

- Adicionar 3 ml de ácido nítrico (HNO_3) 0.02 M y 5 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% al residuo de la operación anterior
- Ajustar el pH a 2.0 con ácido nítrico
- Calentar progresivamente hasta $85 \pm 2^\circ\text{C}$ y mantener esta temperatura durante 2 horas con agitación ocasional
- Dejar enfriar y adicionar 5 ml de acetato de amonio 3.2 M en ácido nítrico al 20 % (v/v)
- Completar a 20 ml con agua desionizada, agitar 30 minutos y separa por centrifugación
- Determinar el contenido de metales en el líquido, el cual representa el contenido ligado a la materia orgánica

Fracción residual

- Verter el residuo sólido anterior a un vaso de teflón con 12 ml de una mezcla 2:1 de ácidos fluorhídrico (HF) y perclórico (HClO_4) concentrados y calentar casi hasta sequedad
- Adicionar 2 ml de HClO_4 y 5 ml de HF, calentar a sequedad

- Agregar otros 2 ml de HClO_4 y evaporar hasta la aparición de humos blancos
- Disolver con HCl 3 N y llevar a 20 ml
- Determinar el contenido de metales a esta solución la cual representa la fracción residual

8.5 Calibración

Ver numeral 7.5.

Las soluciones de estándares deben ser preparadas empleando HCl 0.1N en el caso de sedimentos.

8.6 Cálculos

Determinar la concentración de cada metal, en microgramos por gramo, refiriéndose a la curva de calibración correspondiente.

$$C_m = \frac{C_e \times V_e}{W_m} * f$$

C_m = Concentración de la muestra ($\mu\text{g/g}$)

C_e = Concentración del extracto ($\mu\text{g/ml}$)

W_m = Peso de la muestra seca utilizada para el análisis (g)

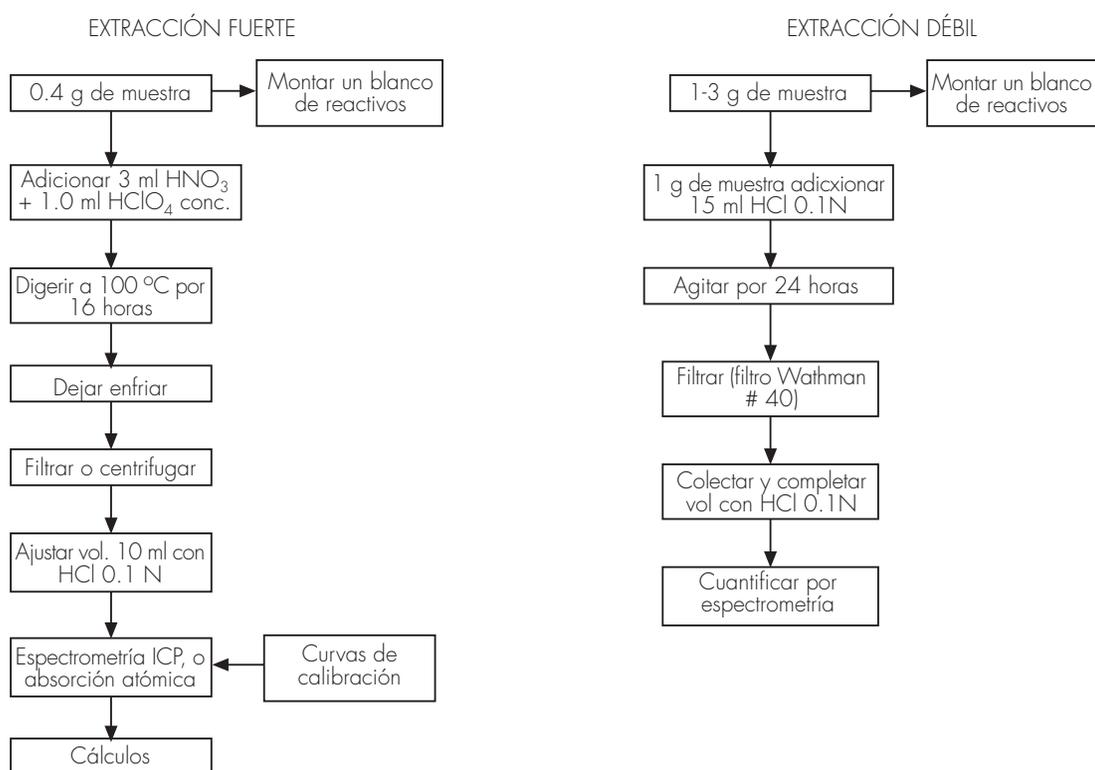
V_e = Volumen del extracto (ml)

f = Factor de dilución

Recomendaciones

Si los valores de las muestras se encuentran por encima del rango de los estándares (curva de calibración), diluir la muestra con solución de HCl. 0.1 N, volver a analizar en el espectro y aplicar el factor de dilución apropiado en los cálculos.

8.7 Diagrama de flujo



8.8 Bibliografía de consulta

FAO. 1975. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Parte 1. FAO fish. Teach. Paper No. 137.

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena, 1993.

Tessier, A., Cambell, P., Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Analytical Chemistry*, 51: 844-851.

Tessier, A., Cambell, P., Bisson, M. 1980. Trace metal speciation of USGS reference sample MAG-1. *Geostandards Newsletter* 4, No. 2, 145-148.

9. Determinación de metales en organismos

La muestra de tejidos orgánicos se digiere cuidadosamente con una mezcla de ácidos que asegura la extracción completa de los metales y la destrucción total del material orgánico. El residuo seco, se redisuelve en una solución de ácido nítrico, se filtra o centrifuga si es necesario y se lleva para su lectura al espectrómetro. El método aquí descrito involucra una digestión ácida completa de los tejidos, una posterior filtración y ajuste del volumen extraído; finalmente, se realiza la cuantificación por una técnica espectrométrica de Absorción o Emisión Atómica Inductivamente Acoplada (ICPS).

Alcance y aplicación

Este método es aplicable a una gran variedad de tejidos biológicos, y permite detectar en el extracto concentraciones del orden de 10^{-6} a 10^{-7} g/l del metal en cuestión.

9.1 Toma de muestra, almacenamiento y preservación

Las muestras se colectan en bolsas plásticas. Para obtener una muestra representativa es necesario establecer de antemano las especies, el género de los individuos, talla, edad o peso, y el tipo de tejido que se analizará (músculo, hígado, tejido graso, etc.); para el caso de peces, 10 individuos son suficientes.

Cuando se analizan moluscos: se colectan ostras entre 5 y 6 cm y almejas entre 5 y 4.5 cm, junto con una muestra de agua del lugar. Con un bisturí de cuchilla nueva, se desprende la piel y se retira el músculo con un cuchillo plástico previamente tratado con HNO_3 10% (en esta operación se pueden emplear trozos de vidrio roto como cuchillos). Guardar en cajas de petri.

La porción que será empleada para el análisis de los demás metales se seca en estufa a 60°C . Una vez seca la muestra, se macera en mortero de porcelana y se almacena en frascos de vidrio, en un lugar fresco y oscuro hasta el análisis. Para el análisis de Hg se debe tomar una submuestra aparte la cual es conservada bajo refrigeración.

Los moluscos se colocan en acuarios con agua del lugar (previamente filtrada en filtros Wathman # 40) y suficiente aireación durante 24 horas. Se abren las conchas con un cuchillo inoxidable, se retira todo el músculo y se coloca en cajas petri

tomando el peso fresco de cada individuo. Con un cuchillo plástico se corta el músculo, se saca una submuestra y el resto se coloca en cajas petri y se seca en estufa 60°C , se pulveriza y se almacena en recipientes de plástico o vidrio hasta su análisis. Para el análisis de Hg, As y Pb se seca la muestra con liofilizador a fin de evitar pérdidas por evaporación.

9.2 Materiales y equipos

Espectrofotómetro de absorción atómica o espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente ICPS.

Desionizador de agua

Embudos de separación de 500 y 2000 ml

Beakers de 50, 100 y 250 ml

Erlenmeyers de 125 ml

Pipetas de 2, 5, 10 y 20 ml

Balones aforados de 100 ml

Balanza analítica

Agitador magnético

Cajas de petri

Cucharas plásticas

Sistema de secado al vacío (liofilizador)

Papel filtro Wathman # 40

Cuchillos plásticos blancos

Embudos plásticos

9.3 Reactivos

Agua libre de metales

Ácido clorhídrico concentrado

Ácido nítrico concentrado

Ácido Perclórico concentrado – HClO_4 : usar grado suprapuro o analítico

Argón ultrapuro grado 5.0 (ICP)

Acetileno y aire (Absorción atómica)

Soluciones de referencia para cada metal (1g/l)

9.4 Procedimiento

- Pesar 0.5 g de muestra seca directamente en el tubo de digestión
- Agregar 3 ml de HNO₃ concentrado. y 1.5 ml de HCl concentrado
- Colocar en el digestor a una temperatura de 180-190 °C (máximo 200 °C) durante 3 horas
- Dejar enfriar la muestra y filtrar o centrifugar
- Colectar el filtrado en balones volumétricos de 25 ml y completar volumen con HCl 0.1N
- Realizar la lectura o cuantificación del extracto por espectroscopía (Absorción o Emisión atómica, ICPS).

9.5 Calibración

Ver numeral 7.5. Las soluciones de estándares deben ser preparadas empleando HCl 0.1N en el caso de organismos.

9.6 Cálculos

Determinar la concentración de cada metal en microgramos por gramo, refiriéndose a la curva de calibración correspondiente.

$$C_m = \frac{C_e \times V_e}{W_m} * f$$

C_m = Concentración de la muestra (µg/g)

C_e = Concentración del extracto en µg/ml

W_m = Peso de la muestra seca utilizada para el análisis en g

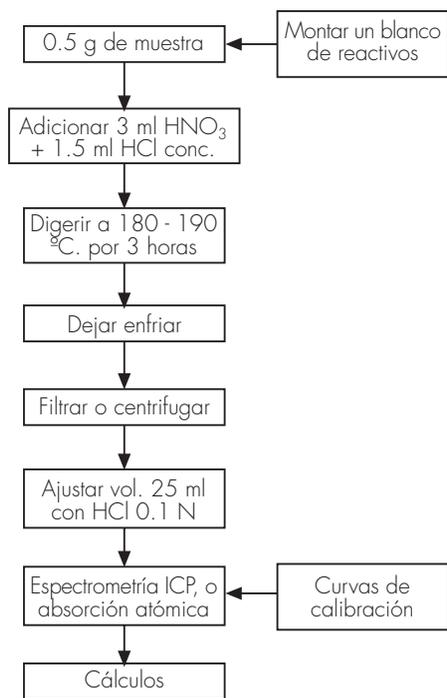
V_e = Volumen del extracto en ml

f = Factor de dilución

Recomendaciones

Son aplicables las mismas recomendaciones dadas en el numeral 8.6. Si los valores de las muestras se encuentran por encima del rango de los estándares (curva de calibración), diluir la muestra con solución de HCl. 0.1 N y volver a analizar en el espectro. Aplicar el factor de dilución apropiado en los cálculos.

9.7 Diagrama de flujo



9.8 Bibliografía de consulta

Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. 1993. Manual de técnicas analíticas de parámetros físico-químicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena.

FAO. 1975. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Parte 1. FAO fish. Teach. Paper No. 137.

Berghof, Maassen. 1995. Operating Instructions Pressure Digestion Systems DAB II+III. Germany.

ANEXOS

SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES - SI

Unidades SI básicas

Cantidad física	Nombre de la unidad SI	Símbolo
Longitud	Metro	m
Masa	Kilogramo	kg
Tiempo	Segundo	s
Corriente eléctrica	Amperio	A
Temperatura termodinámica	Kelvin	K
Intensidad lumínica	Candela	cd
Cantidad de sustancia	Mol	mol

Unidades SI derivadas expresadas en términos de unidades básicas

Cantidad	Unidad SI	
	Nombre	Símbolo
Área	metro cuadrado	m ²
Volumen	metro cúbico	m ³
Velocidad	metro por segundo	m/s
Aceleración	metro por segundo cuadrado	m/s ²
Número de onda	1 por metro	m ⁻¹
Densidad	kilogramo por metro cúbico	kg/m ³
Densidad de corriente	amperio por metro cuadrado	A/m ²
Fuerza de campo magnético	amperio por metro	A/m
Concentración de cantidad de sustancia	mol por metro cúbico	mol/m ³
Volumen específico	metro cúbico por kilogramo	m ³ /kg
Luminancia	candela por metro cuadrado	cd/m ²

Algunas unidades SI derivadas con nombres especiales

Cantidad	Nombre	Símbolo	Expresión en términos de otras unidades	Expresión en términos de unidades SI básicas
Frecuencia	hertz	Hz	s^{-1}	
Fuerza	newton	N	$m \cdot kg \cdot s^{-2}$	
Presión, tensión	pascal	Pa	N/m^2	$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-2}$
Energía, trabajo, cantidad de calor	julio	J	$N \cdot m$	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2}$
Potencia, flujo radiante	watio	W	J/s	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3}$
Cantidad de electricidad, carga eléctrica	culombio	C	$s \cdot A$	
Potencial eléctrico, diferencia de potencial, fuerza electromotriz	voltio	V	W/A	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-1}$
Capacitancia	faradio	F	C/V	$m^{-2} \cdot kg^{-1} \cdot s^4 \cdot A^2$
Resistencia eléctrica	ohmio	Ω	V/A	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-2}$
Conductancia	siemens	S	A/V	$m^{-2} \cdot kg^{-1} \cdot s^3 \cdot A^2$
Temperatura Celsius ⁽¹⁾	grado celsius	$^{\circ}C$	K	
Flujo luminoso	lumen	lm	$cd \cdot sr$	
Iluminancia	lux	lx	lm/m^2	$m^{-2} \cdot cd \cdot sr$

⁽¹⁾ Se utiliza cuando no es necesario considerar temperaturas termodinámicas (a partir del cero absoluto).

Ejemplos de unidades SI derivadas expresadas por medio de una asociación de nombres especiales y unidades básicas

Cantidad	Nombre	Símbolo	Expresión en términos de unidades SI básicas
Viscosidad dinámica	pascal segundo	Pa.s	$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-1}$
Momento de fuerza	metro newton	N.m	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2}$
Tensión superficial	newton por metro	N/m	$kg \cdot s^{-2}$
Densidad de flujo de calor, irradiancia	watio por metro cuadrado	W/m^2	$kg \cdot s^{-3}$
Capacidad calorífica, entropía	julio por kelvin	J/K	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2} \cdot K^{-1}$
Capacidad de calor específico	julio por kilogramo kelvin	$J/(kg \cdot K)$	$m^2 \cdot s^{-2} \cdot K^{-1}$
Conductividad térmica	watio por metro kelvin	$W/(m \cdot K)$	$m \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot K^{-1}$
Fuerza de campo eléctrico	voltio por metro	V/m	$m \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-1}$
Densidad de carga eléctrica	culombio por metro cúbico	C/m^3	$m^{-3} \cdot s \cdot A$
Permitividad	faradio por metro	F/m	$m^{-3} \cdot kg^{-1} \cdot s^4 \cdot A^2$
Permeabilidad	henry por metro	H/m	$m \cdot kg \cdot s^{-2} \cdot A^{-2}$
Energía molar	julio por mol	J/mol	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2} \cdot mol^{-1}$

Prefijos de múltiplos y submúltiplos decimales de las unidades SI

Submúltiplo	Prefijo	Símbolo	Múltiplo	Prefijo	Símbolo
10^{-1}	deci	d	10^1	deca	D
10^{-2}	centi	c	10^2	hecto	h
10^{-3}	mili	m	10^3	kilo	k
10^{-6}	micro	μ	10^6	mega	M
10^{-9}	nano	n	10^9	giga	G
10^{-12}	pico	p	10^{12}	tera	T
10^{-15}	femto	f	10^{15}	peta	P
10^{-18}	ato	a	10^{18}	exa	E

Unidades usadas con el SI

Cantidad física	Unidad	Símbolo	Valor en unidades SI
Tiempo ⁽¹⁾	Minuto	min	1 min = 60 s
	Hora	h	1 h = 60 min = 3 600 s
	Día	d	1 d = 86 400 s
Ángulo plano, arco ⁽²⁾	grado	°	1° = (π /180) rad
	minuto	'	1' = (1/60)° = (π /10 800) rad
	segundo	''	1'' = (1/60)' = (π /648 000) rad
Masa	tonelada ⁽³⁾	t	1 t = 10^3 kg
	unidad de masa atómica unificada ⁽⁴⁾	u	1 u = 1,660 57 $\times 10^{-27}$ kg aproximadamente
Volumen	litro	l	1 l = 1 dm ³ = 10^{-3} m ³
Concentración	mol por litro	mol/l	1 mol/l = 1 mol/dm ³

⁽¹⁾ A estas tres unidades de tiempo, se pueden agregar las unidades semana, mes, año y siglo, pero éstas no tienen definiciones precisas. Su uso debe evitarse en lo posible, pero puede ser conveniente en ciertas circunstancias, p. ej., para medir duraciones geológicas. La International Standard Organization (ISO) ha atribuido al año el símbolo "a" (no "y" ni "yr"); para una mayor precisión, éste símbolo debe estar seguido por un subíndice que especifique el tipo de año concerniente, por ejemplo, a_{trop} para un año tropical (1 a_{trop} = 365,242 20d aproximadamente). En general, si en un texto se usan unidades tales como semana, mes, siglo, se recomienda no usar símbolos sino más bien el nombre completo de tales unidades, o una abreviación establecida en el texto.

⁽²⁾ Para fracciones de ángulos o arcos menores que el segundo, se usan las fracciones decimales de segundo.

⁽³⁾ En algunos países de habla inglesa, esta unidad se llama "tonelada métrica".

⁽⁴⁾ La unidad de masa atómica unificada es igual a la fracción 1/12 de la masa de un átomo del núclido ¹²C. Su valor, en kilogramos, se obtiene experimentalmente.

Algunas unidades que pueden ser usadas temporalmente con el SI

Cantidad física	Unidad	Símbolo	Valor en unidades SI
Presión	bar	bar	1 bar = 10^5 Pa exactamente
Aceleración de caída libre	gal (galileo) ⁽¹⁾	Gal	1 Gal = 10^{-2} m.s ⁻²
Actividad de radionúclidos	curie ⁽²⁾	Ci	1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq = $3,7 \times 10^{10}$ s ⁻¹

⁽¹⁾ El gal es una unidad especial usada en geodesia y geofísica para expresar la aceleración debida a la gravedad.

⁽²⁾ El curie es una unidad especial usada en física nuclear para expresar la actividad de radionúclidos.

Algunas unidades cuyo uso no es recomendado

Cantidad física	Unidad	Símbolo	Valor en unidades SI
Longitud	micra ⁽¹⁾	m ⁽¹⁾	1 m = 1 mm = 10^{-6} m
Área	hectárea	ha	1 ha = 10^4 m ²
Fuerza	kilogramo-fuerza	kgf	1 kgf = 9,806 65 N
Presión	atmósfera,	atm	1 atm = 101 325 Pa exactamente
	atmósfera estándar ⁽²⁾		Pa exactamente
	torr ⁽³⁾	-	1 torr = (101 325/760) Pa = 133,322 368 Pa aprox.
	milímetro de mercurio convencional ⁽⁴⁾	mmHg	1 mmHg = $1,3595 \times 10^{-4}$ Pa = 133,322 387 Pa
Energía	caloría ⁽⁵⁾	cal	
Densidad de flujo magnético	gama	g	1 g = 10^{-9} T

⁽¹⁾ Esta unidad y su símbolo, m, fueron sacadas del SI en la 13ª CGPM, en 1967. Para la misma unidad de longitud, el nombre y símbolo son ahora "micrómetro" y "mm" respectivamente.

⁽²⁾ Se recomienda que "atmósfera estándar" o "atmósfera" no se usen más como unidades de presión. Éste término puede conservarse para representar el valor estándar de 101325 Pa. Es muy conveniente por ejemplo decir que un determinado dato ha sido reducido a la presión de "una atmósfera estándar (101325 Pa)".

⁽³⁾ Se puede tomar : 1 torr = 1 mmHg = 133,322 4 Pa

⁽⁴⁾ Esta unidad (símbolo mmHg, no mm Hg) es conveniente cuando se usa un barómetro de mercurio para leer una presión. Sin embargo, se recomienda que los resultados finales se den en pascuales.

⁽⁵⁾ Se han empleado varias "calorías" :

- una caloría designada "a 15 °C" : 1 cal₁₅ = 4,185 5 J (valor adoptado por la CGPM en 1950);

- una caloría designada "IT" (Tabla Internacional) : 1 cal_{IT} = 4,186 8 J ;

- una caloría designada "termoquímica" : 1 cal_{th} = 4,184 J.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
°/°	Partes por mil
UV	Ultravioleta 180 a 550 nm
VIS	Visible 500 a 750 nm
Abs	Absorbancia
v/v	Volumen a volumen
N	Normalidad

FACTORES DE CONVERSIÓN

CONSTANTES

R =	8.3143 J/mol K	=	0.082054 at . l/mol.K.	=	1.98717 cal/K mol
L =	6.02205 X10 ²³	moléculas/mol			
H =	6.62618 X10 ⁻³⁴	J.s			
G =	6.6720 X10 ⁻¹¹	Nm ² /Kg			
c =	2.997925	m/s			

LONGITUD

1 m	=	100 cm	=	39.37 pulg
1 pulg.	=	2.540 cm		
1°A	=	10 ⁸ cm		
1 milla	=	5280 pies	=	1.609 km
1 pie	=	0.3048 m		
1 yarda	=	0.9144 m		

MASA

1 kg	=	2.205 lb		
1 lb	=	453.6 g		
1 uma	=	1.6604 X 10 ⁻²⁷	kg	
1 onza	=	28.35 g.		

VOLUMEN

1 l	=	61.0237 pul ³			
1 m ³	=	10 ³ l	1 pie ³	=	28.32 l

FUERZA

$$1 \text{ N} = 10^5 \text{ dinas} = 0.2248 \text{ lbf} = 0.102 \text{ kgf}$$

PRESIÓN

$$1 \text{ N/m}^2 = 9.265 \times 10^6 \text{ atm.} = 1.450 \times 10^4 \text{ lbf/pul}^2 = 1 \text{ pascal} = 10 \text{ dinas/cm}^2$$

$$1 \text{ atm} = 14.7 \text{ lbf/pul}^2 = 14.7 \text{ psia}$$

$$1 \text{ bar} = 10^6 \text{ dina/cm}^2$$

$$1 \text{ mmHg} = 133.322 \text{ N/m}^2$$

$$1 \text{ torr} = 1 \text{ atm} / 760$$

TEMPERATURA

$$K = 273.15 + ^\circ\text{C}$$

$$^\circ\text{F} = 9/5^\circ\text{C} + 32$$

ENERGÍA

$$1 \text{ J} = 10^7 \text{ erg} = 0.239 \text{ cal}$$

$$1 \text{ eV} = 1.602182 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$1 \text{ BTU} = 3.968320 \text{ Kcal}$$

$$1 \text{ Hp} = 2544.43 \text{ BTU-hora}$$

POTENCIA

$$1 \text{ W} = 1.341 \times 10^{-3} \text{ hp}$$

$$1 \text{ BTU-hora} = 3412.14 \text{ KW}$$

CORRIENTE ELÉCTRICA

$$\text{Conductancia} = G \text{ (Siemens)} = 1 / R \text{ (Resistencia ohmnica)}$$

$$\text{Conductividad} = K \text{ (S. cm}^{-1}\text{)} = 1 / \rho \text{ (Resistividad)}$$

DENSIDADES (Relativas al agua)

Fe	= 7.86	H ₂ O(4°C)	= 1.000
Hg	= 13.59	EtOH	= 0.791
He	= 1.7847 X 10 ⁻⁴	O ₂	= 1.42904 x 10 ⁻³
N ₂	= 1.25055 X 10 ⁻³	Gasolina	= 0.67
Aire	= 1.2922 X 10 ⁻³	H ₂	= 8.988 X 10 ⁻⁵

Tabla de solubilidad del oxígeno disuelto en el agua, en equilibrio con aire seco a 1 atm (mg O₂/l) *

Temperatura °C	Salinidad 0 psu	Salinidad 9 psu	Salinidad 18.1 psu	Salinidad 27.1 psu	Salinidad 36.1 psu
0	14.62	13.73	12.89	12.1	11.36
1	14.22	13.36	12.55	11.78	11.07
2	13.83	13.00	12.22	11.48	10.79
3	13.46	12.66	11.91	11.2	10.53
4	13.11	12.34	11.61	10.92	10.27
5	12.77	12.02	11.32	10.66	10.03
6	12.45	11.73	11.05	10.4	9.8
7	12.14	11.44	10.78	10.16	9.58
8	11.84	11.17	10.53	9.93	9.36
9	11.56	10.91	10.29	9.71	9.16
10	11.29	10.66	10.06	9.49	8.96
11	11.03	10.42	9.84	9.29	8.77
12	10.78	10.18	9.62	9.09	8.59
13	10.54	9.96	9.42	8.9	8.41
14	10.31	9.75	9.22	8.72	8.24
15	10.08	9.54	9.03	8.54	8.08
16	9.87	9.34	8.84	8.37	7.92
17	9.67	9.15	8.67	8.21	7.77
18	9.47	8.97	8.5	8.05	7.62
19	9.28	8.79	8.33	7.9	7.48
20	9.09	8.62	8.17	7.75	7.35
21	8.92	8.46	8.02	7.61	7.21
22	8.74	8.30	7.87	7.47	7.09
23	8.58	8.14	7.73	7.34	6.96
24	8.42	7.99	7.59	7.21	6.84
25	8.26	7.85	7.46	7.08	6.73
26	8.11	7.71	7.33	6.96	6.62
27	7.97	7.58	7.2	6.85	6.51
28	7.83	7.44	7.08	6.73	6.4
29	7.69	7.32	6.96	6.62	6.3
30	7.56	7.19	6.85	6.51	6.2
31	7.43	7.07	6.73	6.41	6.1
32	7.31	6.96	6.62	6.31	6.01
33	7.18	6.84	6.52	6.21	5.91
34	7.07	6.73	6.42	6.11	5.82
35	6.95	6.62	6.31	6.02	5.73
36	6.84	6.52	6.22	5.93	5.65
37	6.73	6.42	6.12	5.84	5.56
38	6.62	6.32	6.03	5.75	5.48
39	6.52	6.22	5.93	5.66	5.4
40	6.41	6.12	5.84	5.58	5.32
41	6.31	6.03	5.75	5.49	5.24
42	6.21	5.93	5.67	5.41	5.17
43	6.12	5.84	5.58	5.33	5.09
44	6.02	5.75	5.5	5.25	5.02
45	5.93	5.67	5.41	5.17	4.94

*Tomado de Rodier, J.1981. Análisis de las Aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition 20. APHA/AWWA/WPCF. 1134 pp.
- ASTM, 1994. American Society for Testing and Materials. Method D3590. Philadelphia.
- Bendschneider, K. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Sea Water Analysis. Fish. Res. Board of Canada. Edición Ottawa.
- Berghof, Maassen. 1995. Operating Instructions Pressure Digestion Systems DAB II+III. Germany.
- Brown, M.S. 1984. Mangrove litter production and dynamics. En the mangrove ecosystems: research methods; editado por S.C. snedaker y J. E. Snedaker. UNESCO, Paris. 231 – 251 pp.
- CARIPOL. 1980. Manual para la vigilancia de la contaminación por petróleo. IOCARIBE/CARIPOL, pp 12-22.
- Informe del curso regional sobre determinación analítica de plaguicidas organoclorados y PCB'S en biota y sedimentos marinos, Lima, Perú, 23 de enero al 05 de febrero de 1995.
- FAO. 1975. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Parte 1. FAO fish. Teach. paper No. 137.
- FAO. 1984. Métodos Físicos y Químicos de Análisis de Suelos y Aguas. Boletín de suelos de la FAO.
- Fell, J.W., I.M. Master y R.G. Wiegert. 1984. Litter decomposition and nutrient enrichment. En the mangrove ecosystem: Research and methods. Editado por S.C. Snedaker y J.G. Snedaker. UNESCO. Paris.
- Franco, A. 2001. Estrategias de ingestión de *Eucalanus* spp en dos ambientes oceanográficos del Caribe central colombiano. Informe final Proyecto Facultad de Biología Marina – Centro de Investigaciones Científicas. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 79 pp.
- Garay, J.; Panizzo, L.; Ramírez, G.; Sánchez, J. 1993. Manual de técnicas analíticas de parámetros físico-químicos y contaminantes marinos. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, CIOH. Cartagena.
- Grasshoff, K, et al. 1976. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim. New York. 149 pp.
- ICA. 1991. Manejo de muestras y técnicas de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas. Supervisión y control de calidad de pesticidas. Ministerio de Agricultura/ICA Tibaitata.
- ICONTEC, 1995. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-2. Gestión ambiental. calidad del agua. Muestreo. Técnicas generales de muestreo. Bogotá.
- ICONTEC, 1995. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-3. Gestión ambiental. calidad del agua. Muestreo. Directrices para la conservación y manejo de las muestras. Bogotá.

- KIELY, G. 1999. Ingeniería Ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Mc. Graw Hill. España.
- Morris, A.W. y J.P. Riley. The determination of nitrate in sea water. Anal. Chim. Act 29: 272-279.
- Mullin, J.B. y J.P. Riley. 1955. The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural Water. Anal. Chim. Acta 12: 162-176.
- Murphy, J. y J.P. Riley. 1952. A modified single solution method for the examination on phosphate in natural Water. Anal. Chim. Acta.
- Parsons, T.R., Maita, Y. and C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 173 pp.
- Riley, J.P. 1953. The Spectrophotometric determination of amonia in natural water with particular reference to sea-Water Anal. Chim. Acta Vol 9: 575-589.
- Rodier, J.1981. Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar. Ediciones Omega. Barcelona-España.
- Salamanca, M. 1996. Laboratorio de Química Marina. Curso de Química Marina y Guía de Trabajos Prácticos. Departamento de Oceanografía. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción. Concepción. 68 pp.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board of Canada. Segunda Edición. Ottawa.
- UNESCO. 1996. Use of Standards and Reference Materials in the Measurement of Chlorinated Hydrocarbon Residues, Chemistry Workbook. Intergovernmental Oceanographic Commission. Technical series.
- US. EPA. 1980. Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Human and Environmental Samples. Environmental Protection Agency, EPA-600/8-80-038, Health Effects Research Lab. Research Triangle Park, NC.
- US. EPA. 1980. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. Environmental Protection Agency, EPA-600. Cincinnati, Ohio.
- WTW - ORION. 1997. Manual de instrucciones. WTW pHmeter 330.