

4012UY

Determinación de Fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales



Método espectrofotométrico

Elaborado - A. De Nigris

Modificado - C. Grau

Revisado - S. Azambuya, Jefe Sección Físico-Químico

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Se denomina fósforo reactivo al fósforo que reacciona al test colorimétrico sin digestión preliminar. La mayor parte del fósforo reactivo es medido como ortofosfato, existiendo una pequeña porción de fosfatos condensados, los cuales usualmente se encuentran presentes de forma hidrolizada y por tanto, no están disponibles para la determinación.
- 1.2. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Es aplicable también a aguas salobres o salinas.
- 1.3. Para la determinación del fósforo reactivo disuelto, se filtra la muestra a través de membrana 0,45 μm de tamaño de poro.
- 1.4. Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo reactivo en un rango de 18 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$ a 500 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$. El límite de detección es de 3,6 $\mu\text{g PO}_4^- \text{P/L}$.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de Mantenimiento y Control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 93, INE 94)
- 2.6. Instructivo de uso balanza de resolución 0,0001 g (INE 16A, INE 16B)
- 2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 38)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 11)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo reactivo, que se mide en un espectrofotómetro a 880 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. En particular el tartrato de antimonio y potasio es sumamente tóxico por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dicho reactivo.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso. Concentraciones tan bajas como 0,1 mg As/L interfieren con la determinación de fosfatos.
- 5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 ppm y entre 10 % y 15 % más bajos en concentraciones de 10 ppm.
- 5.3. El sulfuro de sodio (Na_2S) y el ion silicato no interfieren en la determinación si se encuentran en concentraciones de 1,0 mg/L y 10 mg/L respectivamente.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. La muestra típica es de 200 mL. Recolectar en frasco de vidrio, lavado sin detergente, enjuagado previamente con ácido clorhídrico (HCl) 1+1.
- 6.2. Mantener la muestra refrigerada a $\leq 6^\circ\text{C}$ ($> 0^\circ\text{C}$).
- 6.3. Filtrar la muestra (si se desea analizar el contenido soluble). Realizar la determinación antes de las 48 h, de lo

contrario, y congelar a temperatura ≤ -10 °C en frasco de vidrio enjuagado con HCl 1+1 en caliente. Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro, longitud de onda 880 nm, con paso óptico de 2,5 cm o mayor.
- 7.2. Celda: Tubos de 25 ó 50 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro con tapa
- 7.3. Balanza de resolución 0,01 g
- 7.4. Balanza de resolución 0,0001 g
- 7.5. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00 mL
- 7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 100 a 1000 μ L
- 7.7. Matraz aforado de 1000 mL.
- 7.8. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 500 mL
- 7.9. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 1000 mL.
- 7.10. Bomba de vacío
- 7.11. Filtros de acetato de celulosa de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 μ m de diámetro de poro.

8. REACTIVOS

- 8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución acuosa de fenoftaleína. Disolver 0,5 g de fenoftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de agua desionizada. Solución estable por 6 meses.
- 8.3. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9), 5 N: diluir 70 mL de H_2SO_4 conc. en 430 mL de agua 8.1.
- 8.4. Reactivo de molibdato de amonio: disolver 20 g de molibdato de amonio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] en 500 mL de agua 8.1. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.
- 8.5. Solución de ácido ascórbico 0,1 M: disolver 1,76 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) en 100 mL de agua 8.1. La solución es estable por una semana a ≤ 6 °C (>0 °C), almacenar en recipiente de vidrio color ámbar.
- 8.6. Solución stock de fosfato, 50 mg P/L: disolver en agua 8.1 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) anhidro y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.
- 8.7. Solución de trabajo, 1 mg P/L. Diluir la solución stock de fosfato 50 veces: 10,00 mL en 500 mL, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso con precisión de 0,01 g. Esta solución es estable por 1 mes.
- 8.8. Solución de tartrato de antimonio y potasio: disolver 1,3715 g de $[K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] ó 1,47 g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 3 H_2O$ en 400 mL de agua 8.1 en un matraz de 500 mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.
- 8.9. Reactivo combinado: Preparar inmediatamente antes del desarrollo de color, 100 mL de reactivo combinado (o la cantidad que se vaya a necesitar), mezclando en el orden dado los siguientes reactivos:
 - 50 mL de H_2SO_4 5 N
 - 5 mL de tartrato de antimonio y potasio
 - 15 mL de molibdato de amonio
 - 30 mL de ácido ascórbico

Importante: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente previo al mezclado. Mezclar después de la adición de cada reactivo. Si la solución presenta turbidez, agitar y dejar reposar por unos minutos hasta que la turbidez desaparezca. En caso que la turbidez no desaparezca, debe reiterarse la preparación de este reactivo. El mismo es estable por 4 horas.
- 8.10. HCl 1+1: se preparara diluyendo HCl Nro. CAS 7647-01-0 comercial, al medio con agua 8.1.

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



9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. El material utilizado debe ser de vidrio.
- 9.2. Todo el material de vidrio, tanto frascos de muestreo como de análisis, deben tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 caliente y finalmente tres enjuagues con agua desionizada.
- 9.3. Todo el material de vidrio utilizado inclusive el de almacenamiento de reactivos deben tener el tratamiento anterior.
- 9.4. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. A partir de la solución de trabajo 1 mg P/L o material de referencia certificado, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados deben ser tomados con pipeta automática de volumen variable 1-10 mL, material aforado o por pesada con precisión 0,01 g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL

Volumen de Solución Trabajo	Volumen final	Concentración en $\mu\text{g P/L}$
0,00	20,00	0
0,20	20,00	10
1,00	20,00	50
2,00	20,00	100
4,00	20,00	200
10,00	20,00	500

- 10.2. Medir un punto de solución control junto con la curva de calibración.
- 10.3. Realizar el ajuste de cero del instrumento con una celda de lectura conteniendo agua desionizada.
- 10.4. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado. A esta medida le llamaremos Abs_{Blanco} .
- 10.5. Agregar una gota de solución de fenoftaleína. Si la solución vira a color rosado, agregar H_2SO_4 5 N en gotas hasta que vire a incoloro. Tomar en cuenta la dilución que estos agregados genera al estándar.
- 10.6. Agregar 3,2 mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.
- 10.7. Medir la absorbancia de las soluciones a 880 nm de longitud de onda, entre 10 y 30 minutos luego de agregado del reactivo combinado. A esta medida le llamaremos Abs_{estandar} .
- 10.8. Realizar la gráfica de $(Abs_{\text{estandar}} - Abs_{\text{Blanco}})$ en función de concentración del estándar en $\mu\text{g P/L}$.

11 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

- 11.1. Preparación de los filtros.
 - 11.1.1. Utilizar filtros de membrana comerciales preparados, en caso contrario, deben ser lavados antes de ser usados, ya que podrían contribuir con cantidades significativas de fósforo a muestras de bajas concentraciones.
 - 11.1.2. Existen dos formas de preparación de filtros:
 - a) empapar 50 filtros en 2 L de agua desionizada durante 1 hora, luego cambiar el agua y dejarlos por tres horas más.
 - b) empapar 50 filtros en 2 L de agua desionizada durante 24 horas.
- 11.2. Filtrar la muestra en caso de determinar fósforo reactivo disuelto.
- 11.3. Pipetear en los tubos o celda de lectura, 20,00 mL de la muestra previamente filtrada o una alícuota de la misma diluida a 20,00 mL. Realizar la toma con pipetas aforadas ó en peso con precisión 0,01 g. Agregar una gota de solución de fenoftaleína. Si la muestra vira a color rosado, agregar H_2SO_4 5 N en gotas hasta que vire a incoloro. Tomar en cuenta la dilución que estos agregados genera a la muestra.
- 11.4. Medir la absorbancia a 880 nm, previo agregado del reactivo combinado. Esta medida corresponde a la Abs_{cero} .

- 11.5. Agregar 3,2 mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.
- 11.6. Medir la absorbancia a 880 nm, (corresponde a Abs_{muestra}), entre 10 y no más de 30 minutos luego del agregado del reactivo combinado.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$(\text{Abs}_{\text{estándar}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) = a \times (\mu\text{g P/L}) + b$$

donde:

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

12.2. La concentración de fosfato en la muestra se calcula según:

$$\text{Fosfato, } \mu\text{g P/L} = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{cero}} - b) \times \text{FD}}{a}$$

donde:

FD: (factor de dilución de la muestra) = Volumen final / Toma de la muestra

Abs_{cero}: corresponde a la absorbancia de la muestra previo al agregado del reactivo combinado, si no se lee la Abs_{cero} sustituir esta por la Abs_{blanco}.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** tomar la cantidad necesaria de la solución de “Control de Fósforo” (elaborada por el Responsable de Calidad o quien indique) en un tubo o celda de lectura, realizar la toma de forma tal que la concentración final resulte en el medio de los valores de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Comparar el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición del análisis. (Según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.2. **Recuperación de la fortificación:** fortificar todas las muestras de aguas residuales y 1 de cada 5 de las muestras de agua natural con 100 µL de la solución control de 50 mg P/L. Se compara el resultado con su valor original y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar repetición el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).
- 13.3. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos correspondientes (según Manual de Control de Calidad Analítico). La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos. En caso de desvío, se deberá evaluar la repetición del análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Métodos 4500–P A Phosphorus Introduction, 4500-P B Sample preparation y 4500-P E Ascorbic Acid Method pp 4-148 a 4-152 y 4-155 a 4-157.