

# LIMNOLOGÍA BÁSICA 2010

## MÉTODOS DE FÍSICO-QUÍMICA DE AGUA

### 1. SÓLIDOS TOTALES Y MATERIA ORGÁNICA EN SUSPENSIÓN

**Introducción.** El material mayor a 0.45 µm en suspensión presente en el agua se considera material particulado, mientras que la fracción menor a 0.45 µm es considerada como disuelta. El material particulado en suspensión (seston) se compone de una fracción orgánica (organismos vivos, restos de organismos, etc.) y una fracción inerte (minerales y otras sustancias inorgánicas).

#### Obtención de muestras

- Obtener una muestra de agua de de 0.5 a 1 litro con botella muestreadora tipo Ruttner o Schindler.
- Almacenar en botella de plástico o vidrio y mantener a menos de 5 °C hasta el procesamiento.

#### SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

**Método gravimétrico.** Consiste en filtrar un volumen conocido de muestra, y por diferencia de peso, obtener la cantidad de material sólido retenido en el filtro.

#### MATERIA ORGÁNICA EN SUSPENSIÓN

**Método de ignición/gravimetría.** Consiste en eliminar la materia orgánica presente en el material en suspensión retenido en un filtro GF/C, quemando la muestra a 500 °C, y obtener la cantidad de material orgánico por diferencia de peso.

*Material.* Filtros GF/F (0.6-0.7 µm); pinzas; Probetas; Equipo de filtración; Mufla

#### Procedimiento para determinar sólidos en suspensión

- Pesar un filtro GF/C con una precisión de décimas de miligramo.
- Homogeneizar la muestra y filtrar un volumen conocido a través del filtro GF/C.
- Secar el filtro a menos de 110 °C durante 12 horas.
- Pesar el filtro nuevamente.

#### Procedimiento para determinar materia orgánica en suspensión

- Quemar el filtro usado para determinar sólidos en suspensión, a 500 °C durante 15 minutos.
- Pesar el filtro nuevamente.

#### Cálculos

mg/l de sólidos

$$\text{en suspensión} = \frac{(\text{peso filtro seco, en g}) - (\text{peso filtro, en g}) \times 10^6}{\text{volumen filtrado (ml)}}$$

mg/l de materia

orgánica

$$\text{en suspensión} = \frac{(\text{peso filtro seco, en g}) - (\text{peso filtro quemado, en g}) \times 10^6}{\text{volumen filtrado (ml)}}$$

% de materia

$$\text{orgánica en suspensión} = \frac{\text{mg/l de materia orgánica en suspensión} \times 100}{\text{mg/l de sólidos en suspensión}}$$

## 2. ALCALINIDAD Y CARBONO INORGÁNICO

**Introducción.** La alcalinidad numéricamente expresa la cantidad de bases (Ca, Mg, Na y K) en equilibrio (sales) con los aniones principales ( $\text{HCO}_3$ ,  $\text{CO}_3$ , Cl y  $\text{SO}_4$ ). En las aguas dulces se debe principalmente a la presencia de carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinotérreos (calcio y magnesio), por ser éstos los iones más abundantes en estos sistemas. Permite estimar la concentración de carbono inorgánico en el medio.

**Método de Wattenberg.** La alcalinidad total se determina titulando una muestra de agua de volumen conocido (no menos de 100 ml), con un ácido fuerte ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  o HCl) de concentración conocida (usualmente 0.02 N). El volumen de ácido necesario para llevar la muestra a pH 4.3-4.9 (transformación de todo el carbono inorgánico en  $\text{CO}_2$  libre), indica la alcalinidad. El punto final se determina potenciométricamente (pHmetro). El punto final de la titulación puede variar de acuerdo al rango de alcalinidad de la muestra:

Alcalinidad (mg $\text{CaCO}_3$ /l)	pH
< 30	4.9
hasta 150	4.6
hasta 500	4.3

### Cálculos

$$\text{Alcalinidad (meq de base valorada/l)} = \frac{\text{Concentración ácido (eq/l)} \times \text{Volumen ácido (ml)} \times f \times 1000}{\text{Vol. muestra (ml)}}$$

f. factor del ácido (1 si la normalidad es exactamente 0.02)

1 meq/l = 50 mg  $\text{CaCO}_3$ /l = 12 mg C/l = 20 mg Ca/l

**Método de Gran.** El valor de alcalinidad puede ser obtenido con mayor precisión determinando el pH final de titulación a partir de la inflexión de una curva de titulación, graficando la variación de pH contra incrementos reducidos de ácido. El volumen final de titulación se retroextrapola para el punto de equivalencia deseado. Los cálculos son iguales a los del método de Wattenberg, si los demás factores se mantienen iguales.

## 3. ESPECTROFOTOMETRÍA

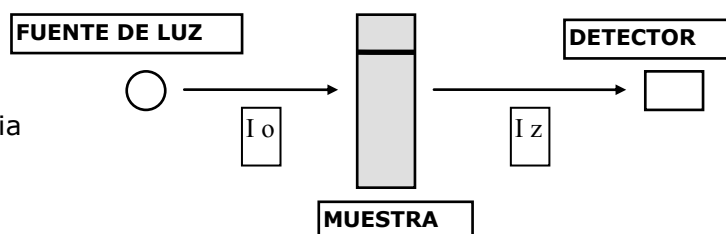
### Principio

El principio del método espectrofotométrico, que permite calcular la concentración de sustancias disueltas en el agua, se basa en que cada sustancia posee un *espectro molecular característico*, o sea que absorbe luz de diferentes longitudes de onda en forma diferencial, de acuerdo a su estructura atómica. Cuando un fotón golpea un átomo o una molécula, se produce una absorción de energía por parte de algunos de los átomos. La capacidad de un compuesto para absorber fotones depende de su estructura atómica, y en particular de la ordenación de los electrones que rodean al núcleo atómico. Cada molécula puede ser excitada solamente por fotones de ciertas longitudes de onda (lo que determina el espectro de absorción molecular característico) debido a que la excitación no es continua sino cuantizada (la energía luminosa es absorbida solamente en cantidades discretas).

La base teórica de la espectrofotometría es la Ley de Beer-Lambert:

$$I_z = I_0 e^{-klc}$$

$I_z$ . Intensidad de la luz transmitida  
 $I_0$ . Intensidad de la luz incidente  
 $k$ . coeficiente de absorción de la sustancia  
 $l$ . longitud del trayecto óptico  
 $c$ . concentración de la muestra



La luz que pasa a través de una sustancia en solución es absorbida en forma exponencial, y en cantidad proporcional a la concentración de la sustancia, ya que los demás factores se mantienen constantes.

### Método colorimétrico

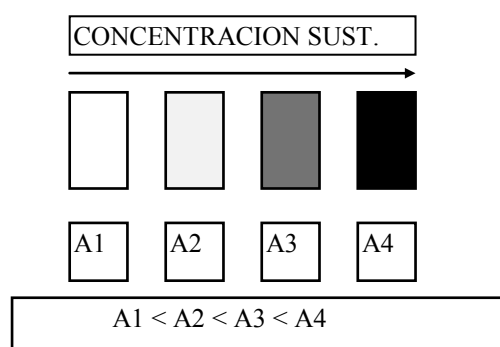
Consiste en inducir en la muestra, el desarrollo de un color de intensidad proporcional a la concentración de la sustancia problema, mediante el uso de reactivos específicos para cada sustancia. La intensidad del color desarrollado se mide espectrofotométricamente en términos de absorbancia ( $A$ ), que es el producto de la absorptividad o coeficiente de extinción característico de la sustancia ( $k$ ), la longitud del trayecto óptico o espesor de la celda ( $l$ ), y la concentración de la muestra ( $c$ ):

$$A = K.l.c$$

$$I_z = I_0 e^{-k.l.c}$$

$$I_z = I_0 e^{-A}$$

$$A = \log \frac{I_0}{I_t}$$



Estas relaciones son ciertas para la luz monocromática, pero cuando se utilizan haces de luz policromática, se observan desviaciones de estas ecuaciones. Debido a esto se realizan curvas estándar de referencia para cada método analítico a partir de soluciones de concentración conocida, que permitan interpolar los valores de absorbancia de las muestras problema.

### Blancos

La absorbancia total ( $Abs_{total}$ ) de una muestra a cierta longitud de onda incluye la absorbancia específica del complejo coloreado, proporcional a la concentración del elemento analizado ( $Abs_{complejo}$ ), y también de los reactivos químicos utilizados ( $Abs_{reactivos}$ ) y de la turbidez de la muestra de agua original ( $Abs_{muestra}$ ):

$$Abs_{total} = Abs_{complejo} + Abs_{reactivos} + Abs_{muestra}$$

Para conocer la absorbancia de los reactivos y de la muestra de agua, se construyen los blancos de reactivos y blancos de turbidez.

### Cálculo de la concentración

La absorbancia del complejo coloreado, proporcional a la concentración del elemento, será:

$$Abs_{complejo} = Abs_{total} - Abs_{reactivos} - Abs_{muestra}$$

Obtenido el valor de la absorbancia del compuesto, se calcula la concentración del mismo en la muestra, mediante una curva de calibración.

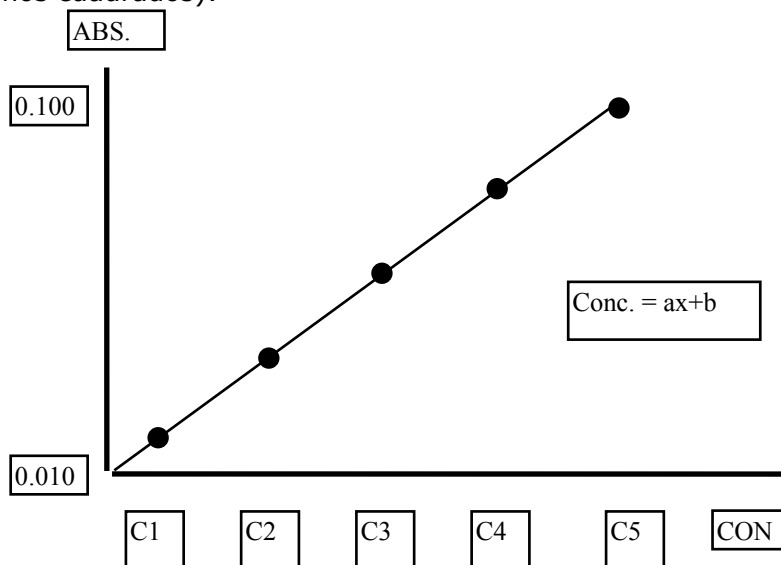
## Curva de calibración

Es una curva de absorbancia y concentración a partir de soluciones de concentración conocida, que sirve para interpolar la absorbancia de muestras de concentración desconocida. La operación se realiza mediante el cálculo de una regresión lineal simple entre las concentraciones y las absorbancias de las diluciones (mínimos cuadrados):

$$\text{Concentración} = \text{Absorbancia} \cdot a + b$$

- pendiente de la curva
- intersección de la curva con las abscisas

Concentración n	Absorbancia
C1	0.009
C2	0.019
C3	0.036
C4	0.098



## 3.1. FOSFATO

### Obtención de muestras

- Obtener una muestra de agua con botella muestreadora Ruttner de vidrio o acrílico.
- Si se debe almacenar, congelar lo más rápido posible o si no es posible agregar 0.25 ml de ácido sulfúrico. Si la muestra contiene mucho material en suspensión filtrar previamente al congelado (si no se desea analizar la concentración de fósforo total).

**Principio del método molibdofosfórico.** Basado en el principio de la formación del complejo molibdofosfórico, la técnica consiste en la reducción del mismo a un compuesto denominado azul de molibdeno en fase acuosa. La intensidad del azul de molibdeno, proporcional a la concentración de ortofosfato, es medida en términos de absorbancia y transformada a concentración mediante una curva de calibración.

### Procedimiento de Murphy & Riley (1962).

*Rango.* 10 -100  $\mu\text{g P-PO}_4 \text{ l}^{-1}$  (la relación es lineal hasta ca. 650  $\mu\text{g/l}$ ).

*Precisión.* 10  $\mu\text{g P-PO}_4 \text{ l}^{-1}$  (para celda de 5 cm)

*Reactivos.*

Solución de molibdato de amonio. 15 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 500 ml de AD.

Solución de ácido sulfúrico. 140 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 900 ml de AD

Solución de ácido ascórbico. 27 g de ácido ascórbico en 500 ml de AD.

Solución de tartrato de antimonio-potasio. 0.34 g de tartrato de antimonio y potasio en 250 ml de AD.

Reactivo mixto (para 10 muestras). Mezclar 10 ml de molibdato de amonio, 25 ml de ácido sulfúrico, 10 ml de ácido ascórbico y 5 ml de tartrato de antimonio y potasio cada vez que se realice el análisis (no almacenar más de 6 horas).

*Material.* Debe ser previamente lavado con ácido sulfúrico o clorhídrico diluido.

Filtros GF/C (aprox. 1  $\mu\text{m}$ )

Matraces erlenmeyer de 100 ml

Pipetas aforadas de 50 ml; pipetas graduadas de 10 y 50 ml

Probetas

Espectrofotómetro

Equipo de filtración

*Procedimiento*

Colocar 10 ml de muestra filtrada por GF/C en tubos de vidrio.

Agregar 1 ml de reactivo mixto. Mezclar en vortex.

Luego de 5 minutos y antes de 2-3 horas medir la absorbancia de la muestra a 885 nm en celda de 1 cm, corrigiendo el valor del blanco de reactivos y de turbidez de la muestra.

Calcular la concentración de la muestra usando la ecuación de la curva de calibración.

*Blanco de reactivo y turbidez.* El blanco de reactivos consiste en 10 ml de AD más 1 ml de reactivo mixto, el que se trata como las muestras. El valor del blanco de turbidez es la absorbancia de la muestra filtrada no tratada a 885 nm.

*Serie standard.*

Solución stock. 4.393 g de fosfato hidrógeno de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) desecado más 1 ml de ácido sulfúrico hasta 1 l de AD. La solución contiene 1 mg P/ml (32.258  $\mu\text{g}$ at P/l).

Solución de trabajo. Diluir 1 ml de la solución stock a 1 l de AD. La solución contiene 1  $\mu\text{g}$  P/ml.

Diluciones. Preparar 5 diluciones entre 0 y 100  $\mu\text{g}$  P/l (100, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g}$  P/l).

Se tratan 50 ml de cada dilución como las muestras, y con los valores de absorbancia y concentración se construye la curva de calibración. Se calculan los parámetros de la curva por mínimos cuadrados (regresión lineal simple).

## 3.2. NITRATO EN AGUA DULCE

**Principio del método** En presencia de salicilato de sodio, el nitrato da un compuesto de sustitución (p-nitrosalicilato) de color amarillo (Müller & Weideman, 1955).

**Procedimiento de Müller & Weidemann (1955).**

*Rango.* 0.1 a 2 mg N- $\text{NO}_3$  l<sup>-1</sup>

*Precisión.* 0.1 mg N- $\text{NO}_3$  l<sup>-1</sup>

*Reactivos*

Solución de salicilato de sodio. Disolver 0.5 g de salicilato de sodio en 100 ml de agua destilada. Preparar solución fresca cada vez.

Solución oxidante. 50 g de persulfato de potasio y 30 g de ácido bórico en 350 ml de hidróxido de sodio 1 M. Completar a 1000 ml y guardar en botella oscura.

Acido sulfúrico concentrado

*Material.* Debe ser previamente lavado con ácido sulfúrico diluído.

Filtros GF/F (0.6-0.7  $\mu\text{m}$ )

Matraces erlenmeyer de 100 ml

Pipetas aforadas de 25 ml, pipetas graduadas de 10 ml

Probetas de 100 ml

Espectrofotómetro

Equipo de filtración

*Procedimiento*

- Colocar 25 ml de muestra filtrada por GF/C en matraz erlenmeyer de vidrio de 100 ml.
- Agregar 1 ml de solución de salicilato de sodio. Mezclar.
- Evaporar la muestra a menos de 110 °C.
- Con la muestra aún caliente disolver el residuo con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Agregar 50 ml de agua destilada. Mezclar. Agregar 7 ml de solución de tartrato de sodio y potasio.
- Llevar a 100 ml con agua destilada. Medir la absorbancia inmediatamente a 420 nm, corrigiendo el valor del blanco de reactivos y de turbidez de la muestra.
- Calcular la concentración de la muestra usando la ecuación de la curva de calibración.

*Blanco de reactivo y turbidez.* El blanco de reactivos consiste en 20 ml de AD más 1 ml de solución de salicilato, el que se trata como las muestras. El valor del blanco de turbidez es la absorbancia de la muestra filtrada no tratada a 420 nm.

*Serie standard.*

Solución stock, solución de trabajo y diluciones se preparan a partir de un patrón de nitrato de concentración conocida. Se tratan 25 ml de cada dilución como las muestras, y con los valores de absorbancia y concentración se construye la curva de calibración. Se calculan los parámetros de la curva por mínimos cuadrados (regresión lineal simple).

### 3.3. NITRITO

**Principio del método de sulfanilamida**, para la determinación de los nitritos en el agua basados en la reacción de Griess, en la cual el ácido nitroso es transformado en un compuesto fuertemente coloreado de rojo (Strickland & Parsons 1972). El rango del método es 0.14 a 35  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

#### *Procedimiento*

- 1) A 25 ml de muestra filtrada agregar 0.5 ml de sulfanilamida y agitar.
- 2) Esperar de 2-10 minutos y agregar 0.5 ml de N-(1-naftil)-etilendiamina y agitar.
- 3) Luego de 10 min y antes de 2 h, medir la absorbancia a 543 nm en una celda de 1 cm.
- 4) Calcular la concentración de nitritos usando una curva de calibración.

#### *Reactivos*

- Sulfanilamida: Disolver 5 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  en una mezcla de 50 ml de HCl concentrado y aproximadamente 300 ml de AD. Mezclar y diluir a 500 ml. La solución es estable por varios meses.
- N-(1-naftil)-etilendiamina: Disolver 0.5 g de  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$  en AD libre de nitritos y llevar a 500 ml. Almacenar la solución en frío en botella oscura. Preparar cada vez que tome color pardo.
- Solución estándar: Disolver 1.232 g de  $\text{NaNO}_2$  previamente secado a 110 °C y llevar a 1 l con AD. La solución contiene 250  $\mu\text{g NO}_2\text{-N ml}^{-1}$

### 3.4. AMONIO

**Principio del método de azul de indofenol**. En medio alcalino tamponado con citrato, la muestra se trata con fenol, usando nitroprusiato de sodio como catalizador, obteniéndose un compuesto denominado Azul de Indofenol.

#### **Procedimiento de Koroleff (1970)**

*Rango.* 10 – 350  $\mu\text{g N-NH}_4 \text{l}^{-1}$

*Precisión.* 10  $\mu\text{g N-NH}_4 \text{l}^{-1}$

#### **Reactivos**

Reactivo A. Disolver 17.5 g de fenol y 200 mg de nitroprusiato de sodio deshidratado y diluir con agua libre de amonio hasta 500 ml.

Reactivo B. Disolver 140 g de citrato de sodio y 7.5 g de hidróxido de sodio en 400 ml de agua destilada. Agregar 17.5 ml de hipoclorito de sodio concentrado y llevar a 500 ml. Filtrar por GF/C.

#### **Procedimiento**

- Colocar 10 ml de muestra filtrada por GF/F en tubo de vidrio de 25 ml.
- Agregar 0.6 ml de reactivo A. Mezclar en vortex.
- Luego de 2 minutos agregar 0.6 ml de Reactivo B. Mezclar y almacenar 1 hora en la oscuridad. Medir la absorbancia de la muestra a 630 nm, corrigiendo el valor del blanco de reactivos y de turbidez de la muestra.
- Calcular la concentración de amonio usando la ecuación de la curva de calibración.

**Blanco de reactivo y turbidez.** El blanco de reactivos consiste en 10 ml de AD más 0.6 ml de cada reactivo. El valor del blanco de turbidez es la absorbancia de la muestra filtrada sin reactivos, a 630 nm.

#### **Serie standard**

*Solución stock.* Preparar una solución patrón de 2000  $\mu\text{g-at/l}$  de amonio.

*Solución de trabajo.* Diluir 10 ml de la solución stock a 100 ml de AD. La solución contiene 200  $\mu\text{g-at/l}$ .

*Diluciones.* Preparar 5 diluciones entre 1 y 20 µg-at/l (llevar 0.5, 1, 2.5, 5, y 10 ml de la solución hija a 100 ml con agua destilada. Las concentraciones corresponden a 1, 2, 5, 10 y 20 µg-at/l).

Se tratan 10 ml de cada dilución igual que las muestras, y con los valores de absorbancia y concentración se construye una curva de calibración para amonio. Se calculan los parámetros de la curva por mínimos cuadrados (regresión lineal simple).

### 3.4. FÓSFORO Y NITRÓGENO TOTAL EN AGUA

**Principio del método** Se basa en la oxidación simultánea de la mayor parte de los compuestos nitrogenados en un medio básico y de los fosforados en medio ácido. Esto es posible por la acción de un sistema ácido bórico-hidróxido de sodio. La digestión se realiza con persulfato de potasio a 124 °C. Método de Valderrama (1981) para muestras de agua y sedimento.

#### Procedimiento

- Tomar 40 ml de muestra sin filtrar (en el caso de analizar la muestra filtrada se estará determinando el nitrógeno y fósforo total disuelto)
- Agregar 8 ml de reactivo oxidante (la muestra puede conservarse hasta 70 días)
- Colocar en autoclave durante 30 min.
- Fraccionar la muestra para determinación de fósforo y nitrógeno de acuerdo a los procedimientos descritos para nitrato y fosfato.

La fracción TOTAL =  $\Sigma$  inorgánica disuelta + orgánica disuelta + particulada.

La fracción TOTAL disuelta =  $\Sigma$  inorgánica disuelta + orgánica disuelta

#### Reactivos

Reactivo oxidante: disolver 50 g de persulfato de potasio (libre de N) y 30 g de ácido bórico en 350 ml de hidróxido de sodio 1M. Completar hasta 1 L con agua milli-Q. Almacenar en frasco de vidrio oscuro (reactivo fotosensible) y a temperatura ambiente. Solución estable por 6 a 8 meses.

#### Referencia

Valderrama, JC (1981). The simultaneous analysis of total N and total P in natural waters. Mar Chem 10:109-122.